

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Erika Zrníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně genetická charakteristika mery
černožilné (*Cacopsylla melanoneura*)**

Bakalářská práce

Erika Zrníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Erika ZRNÍKOVÁ
Osobní číslo: R20734
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Molekulárně genetická charakteristika mery černožilné (*Cacopsylla melanoneura*)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše na téma
 - mery, vektory fytoplazem, a jejich molekulární detekce;
 - využití genů pro cytochrom c oxidázu a 16S rRNA pro identifikaci organismů.
2. Analýza vybraného souboru jedinců *C. melanoneura*
 - Izolace DNA, PCR amplifikace cílových genových fragmentů, Sangerovo sekvenování, bioinformatická analýza.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

- Malagnini et al. (2013) Ecological and genetic differences between *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera, Psyllidae) populations reveal species host plant preference. *PLoS One* 8(7): e69663.
- Janik et al. (2020) Apple Proliferation - a Joint Review. Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38098 San Michele all'Adige (TN) - Laimburg Research Centre, Laimburg 6, 39040 Ora (BZ).
- Oettl et Schlink (2015) Molecular identification of two vector species, *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla picta* (Hemiptera: Psyllidae), of apple proliferation disease and further common psyllids of Northern Italy. *J Econ Entomol* 108(5):2174-83.
- Porter et al. (2014) Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier *Mol Ecol Resour.* 2014 Sep; 14(5): 929-942.
- Wilson (2012) DNA barcodes for insects. In: Clifton (ed.) *Methods in molecular biology*, 858:17-46.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. dubna 2022

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Erika Zrníková

Názov práce: Molekulárne genetická charakteristika mery černožilné (*Cacopsylla melanoneura*)

Typ práce: bakalárska

Pracovisko: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedúci práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Kľúčové slová: cytochróm c oxidáza podjednotka I, 'Candidatus Phytoplasma mali', proliferácia jablone, Sangerovo sekvenovanie

Počet strán: 48

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

ABSTRAKT

Bakalárska práca sa zaoberá charakteristikou mér, najmä z r. *Cacopsylla*, ich molekulárnou detekciou, s dôrazom na *Cacopsylla melanoneura*, vektora fytoplazmy 'Candidatus Phytoplasma mali', pôvodcu ochorenia proliferácie jabloní. Teoretická časť bakalárskej práce sa zameriava na zhrnutie poznatkov o mérach, ich výskytu, biológii vrátane životného cyklu, pričom charakterizuje zástupcu patriaceho do tejto taxonomickej skupiny. Taktiež sa v tejto časti spomína ich rola pri šírení fytoplazmy, významných patogénov rastlín, a súčasné metódy na molekulárnu identifikáciu mér založenú najmä na analýze COI génu mitochondriálnej DNA.

V rámci experimentálnej časti bakalárskej práce bolo analyzovaných 32 jedincov mér *Cacopsylla melanoneura* pochádzajúcich z troch lokalít na južnej Morave odchytených v rokoch 2006 a 2022. Sangerovým sekvenovaním CPF4 a CPR4 PCR amplikónov boli získané parciálne sekvencie COI mér *Cacopsylla melanoneura* o dĺžke približne 600 bp. Väčšina získaných sekvencií vykazovala vysokú podobnosť a 99,2-100% identitu so sekvenciami génu COI zástupcov *Cacopsylla melanoneura* dostupnými v databáze GenBank, traja jedinci vykazovali identitu nižšiu (92%) s týmito sekvenciami, pričom sa aj tak jednalo o zástupcov tejto méry. Pri dvoch jedincoch bola zistená príslušnosť k iným druhom r. *Cacopsylla*, v jednom prípade bola identifikovaná samica *C. picta* a v druhom prípade bola zistená najbližšia podobnosť s *C. burckhardti*. Fylogenetickou analýzou boli tieto zistenia potvrdené. Získané výsledky jednoznačne potvrdzujú vhodnosť využitia analýzy COI génu pre molekulárnu identifikáciu mér r. *Cacopsylla*.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Erika Zrníková

Title: Molecular characterisation of psyllid *Cacopsylla melanoneura*

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science Palacký

University Olomouc

Supervisor: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Keywords: cytochrome c oxidase subunit I, 'Candidatus Phytoplasma mali', apple proliferation, Sanger sequencing

Number of pages: 48

Number of appendices: 0

Language: Slovak

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the characterisation of psyllids, especially of the genus *Cacopsylla*, their molecular detection, with emphasis on *Cacopsylla melanoneura*, a vector of the phytoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali', the causal agent of apple proliferation disease. The theoretical part of the thesis focuses on summarising the knowledge of psyllids, their occurrence, biology including their life cycle, and characterisation of representatives belonging to this taxonomic group. This part also mentions their role in the spread of phytoplasmas, important plant pathogens, and current methods based mainly on the analysis of the COI mitochondrial DNA gene which are used for the molecular identification of psyllids.

In the experimental part of the bachelor thesis, 32 individuals of *Cacopsylla melanoneura* from three localities in southern Moravia, collected in 2006 and 2022, were analysed. Partial COI sequences of *Cacopsylla melanoneura* psyllids were obtained by Sanger sequencing of CPF4 and CPR4 PCR amplicons with a length of approximately 600 bp. Most of the sequences obtained showed high similarity and 99.2-100% identity with the COI gene sequences of *Cacopsylla melanoneura* available in the GenBank database. Three individuals showed lower identity (92%) with these sequences, but still belonged to this psyllid species. Two individuals were found to belong to other *Cacopsylla* species, one was identified as a female *C. picta* and the other was found to be the most similar to *C. burckhardti*. These results were confirmed by phylogenetic analysis. The results obtained clearly confirm the suitability of using COI gene analysis for the molecular identification of *Cacopsylla* psyllids.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Dany Šafářové, Ph.D. s použitím uvedených zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Zrníková Erika

Pod'akovanie:

Rada by som pod'akovala najmä vedúcej mojej bakalárskej práce Mgr. Dane Šafářové, Ph.D. za poskytnutie materiálov, ako aj za jej podporu, trpezlivosť a rady pri písaní práce. Taktiež moje pod'akovanie patrí pani Jane Veselskej za výpomoc pri praktickej časti mojej bakalárskej práce. Experimentálna práca bola podporená z projektu MZe, NAZV QK21020395.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHL'AD	3
3.1	Obecná charakteristika mér	3
3.2	Fytoplazmy, ich interakcie a šírenie	6
3.3	Méry na území Českej republiky	9
3.4	<i>Cacopsylla melanoneura</i> (Förster, 1848)	10
3.5	Príznaky choroby spôsobenej fytoplazmou ' <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> '	11
3.6	Kontrola fytoplazmových ochorení a vektorov	12
3.7	Molekulárna detekcia mér	13
3.8	DNA markery na identifikáciu organizmov	16
4	MATERIÁL A METÓDY	18
4.1	Biologický materiál	18
4.2	Použité chemikálie, súpravy a roztoky	18
4.3	Použité prístroje a zariadenia	19
4.4	Použité metódy	20
4.4.1	Izolácia DNA	20
4.4.2	Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	20
4.4.3	Elektroforetická separácia	22
4.4.4	Izolácia PCR produktov	22
4.4.5	Sekvenačné značenie	23
4.4.6	Bioinformatická analýza	24
5	VÝSLEDKY	26
5.1	Amplifikácia oblasti cytochróm c oxidázy podjednotky I	26
5.2	Analýza genetickej variability a fylogenetická analýza	26
6	DISKUSIA	32
7	ZÁVER	35
8	LITERATÚRA	36

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Prenos fytoplazmy hmyzím vektorom (Rondon *et* Oppedisano, 2020).

Obrázok 2: Porovnanie zdravého (A) a výhonku so symptómami proliferácie jablone (B-D) (Janik *et al.*, 2020).

Obrázok 3: Produkty PCR amplifikácie oblasti cytochróm c oxidázy podjednotky I pomocou primerov CPF4 a CPR4 a MyTaq™ DNA polymerázy vyseparované v 1% agarózovom géle.

Obrázok 4: Analýza genetickej variability parciálnych sekvencií COI génu pri *C. melanoneura* a ďalších zástupcov rodu *Cacopsylla* pomocou algoritmu Muscle a programu SDT2.0.

Obrázok 5: Fylogenetický strom jedincov mér *Cacopsylla melanoneura* a ďalších zástupcov mér zostrojený na základe Neighbor-Joining analýzy parciálnych sekvencií COI génu (MEGA 7.0).

Obrázok 6: Fylogenetický strom mér *Cacopsylla melanoneura* a ďalších zástupcov mér zostrojený na základe parciálnych aminokyselinových sekvencií COI pomocou Neighbor-Joining analýzy (MEGA 7.0).

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Zoznam analyzovaných jedincov *C. melanoneura*

Tabuľka 2: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Tabuľka 3: Podmienky PCR amplifikácie s použitím primerov CPF4/CPR4

Tabuľka 4: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Tabuľka 5: Podmienky PCR sekvenačného značenia

ZOZNAM SKRATIEK

Acc.No.	accession number (prístupové číslo v GenBank)
AFLP	amplified fragment length polymorphism (polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov)
Amp	antigenic membrane protein (antigénový membránový proteín)
BLASTn	nucleotide basic alignment search tool
bp	base pair
COI	cytochróm c oxidáza podjednotka I
COII	cytochróm c oxidáza podjednotka II
ČR	Česká republika
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia) polymorfnej DNA)
RAPD	random amplified polymorphic DNA (náhodná amplifikácia polymorfnej DNA)
RFLP	restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov)
UV	ultrafialové žiarenie

1 ÚVOD

Méry patria k bežne vyskytujúcej sa a rozmanitej skupine hmyzu, ktorá saje rastlinné šťavy na rôznych druhoch rastlín. Méry v Európe, ktoré patria do rodu *Cacopsylla*, sa zaraďujú k dobre známym poľnohospodárskym škodlivým organizmom, keďže niektoré z nich škodia saním, veľké množstvo z nich sú prenášačmi bakteriálnych patogénov - fytoplazmiem. Jedným z významných zástupcov je méra *Cacopsylla melanoneura*, ktorá v niektorých oblastiach prenáša pôvodcu významnej choroby ovocných stromov, proliferácie jabloní, a to fytoplazmu '*Candidatus Phytoplasma mali*'. Táto fytoplazma vyvoláva špecifické či nešpecifické príznaky, pričom k tým špecifickým patrí metlovitosť, u vnímavých kultivarov aj tvorba zväčšených palistov. Kontrola fytoplazmových ochorení je náročná a jej dôležitou súčasťou je kontrola výskytu a šírenia hmyzích vektorov. Vlastná identifikácia na základe morfológických vlastností je veľmi náročná, z toho dôvodu sa pre identifikáciu mér, a to nie len rodu *Cacopsylla*, v súčasnosti rozvíjajú rôzne molekulárne metódy, ako napríklad DNA barcoding, RFLP, AFLP, RAPD a ďalšie, ktoré sa sústreďujú predovšetkým na genetickú analýzu mitochondriálnej DNA.

2 CIELE PRÁCE

1. Vypracovanie literárnej rešerše na tému

- méry, vektory fytoplazmiem, a ich molekulárna detekcia;
- využitie génov pre cytochrom c oxidázu a 16S rRNA na identifikáciu organizmov.

2. Analýza vybraného súboru jedincov *Cacopsylla melanoneura*

- izolácia DNA, PCR amplifikácia cieľových génových fragmentov, Sangerovo sekvenovanie, bioinformatická analýza.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Obecná charakteristika mér

Méry predstavujú celosvetovo rozšírený malý hmyz sajúci rastlinnú šťavu, nachádzajúci sa na rôznych druhoch rastlín. Z taxonomického hľadiska ich zaraďujeme do nadčelade Psylloidea (merovitě), podrádu Sternorrhyncha (voškovce) a rádu Hemiptera (polokrídlovce) (Gullan *et* Martin, 2009; Ouvrard *et al.*, 2015a).

Najstaršia prvá zmienka o existencii špecifického druhu méry pochádza z Francúzska, kedy entomológ Réaumur v roku 1737 rozsiahlo opísal dva druhy *Homotoma ficus* a *Asphagidella buxi* (Conci, 1998).

Výskyt a rozšírenie mér súvisí s podnebím danej krajiny, keďže méry sú vysoko citlivé na teplotu, vlhkosť a majú veľkú špecifitu k hostiteľskej rastline (Hodkinson, 2009). Na svete je doposiaľ popísaných 3 800 druhov, no najrozmanitejšie sú v tropických a subtropických oblastiach (Moreno *et al.*, 2021; Ouvrard *et al.*, 2015a). V Európe táto skupina zahŕňa približne 323 druhov, avšak v strednej Európe (Rakúsko, Belgicko, Česká republika, Slovensko, Nemecko, Maďarsko, Holandsko, Poľsko, Švajčiarsko, Luxembursko) to je približne 194 druhov mér (Ouvrard *et al.*, 2023).

Veľkosť mér je zhruba od 1,5 mm do 4 mm a ich vzhľad do určitej miery pripomína cikády. Ako živočichy sú méry veľmi jemné a je možné ich dotykom ľahko poškodiť. Je to z toho dôvodu, že ich kutikula je celkom tenká. Avšak je pružná a pevná, ale nedosahuje až takej tvrdosti ako sa vyskytuje pri plošticiach a cikádach. Ich telo je členené na tri časti: hlava (caput), hrud' (thorax) a zadok (abdomen). Najtvrdšia a najhrubšia je kutikula na hlave a hrudi, následne na zadku je tenšia a pružnejšia. Až na niektoré výnimky je ochlpenie mér riedke a ich sfarbenie nie je stále. Nestálosť sfarbenia je spôsobená tým, v ktorom ročnom období sa jedinci vyskytujú alebo či daní jedinci prezimovali. K základným farbám patrí žltá s rôznymi odtieňmi a sýtosťami, zelená, oranžová, červená, hnedá a nakoniec čierna (Vondráček, 1957). Méry patria k slabým letcom, ale sú vynikajúcimi skokanmi vďaka zadným nohám, ktoré sú zväčšené (Hodkinson, 2015). Charakteristickým znakom tohto skákania je, že méry majú na začiatku hlavu smerujúcu nadol a následne po vzlietnutí sa telo rýchlo otáča (Burrows, 2012).

Méry majú typický hemimetabolický životný cyklus, ktorý sa zvyčajne skladá z vajíčka, piatich larválnych štádií a pohlavne sa rozmnožujúceho dospelého jedinca. V rámci populácie pomer samíc a samcov vykazuje len malú odchýlku (Fisher *et al.*, 2014; Hodkinson *et* Bird, 2006).

Doba trvania embryonálneho a larválneho štádia je rozdielna u jednotlivých druhov, jedincov na tej istej rastline a taktiež je závislá na vonkajších podmienkach (Vondráček, 1957). V meniacich sa podmienkach životný cyklus vykazuje rôzne modifikácie. V optimálnych teplých a vlhkých podmienkach má tendenciu byť kontinuálny s viacerými generáciami ročne (Atwal *et al.*, 1970; Pande, 1972). Väčšina druhov mierneho pásma má jednu generáciu ročne (Watmough, 1968). V oblastiach mierneho pásma a v arktických oblastiach sa na prežitie zimného obdobia alebo obdobia, kedy je hostiteľská rastlina neaktívna vyvinul mechanizmus prezimovania vo všetkých životných štádiách. Avšak vždy určitý druh prezimuje v určitom štádiu. Vajíčka sa počas prezimovania zvyčajne nachádzajú na nečinných púčikoch hostiteľskej rastliny. Larvy je možné nájsť napríklad pod šupinami púčikov alebo v pazuchách listov. Dospelé jedince sa vyskytujú hlavne na ihličnanoch, no neskôršie na jar pred pučaním sa vrátia na svoju pravú hostiteľskú rastlinu, aby sa spáрили a nakládli vajíčka, keďže sa larvy nemôžu vyvíjať na ihličnatej strave (Čermák *et al.*, 2008; Gallinger *et al.*, 2018; Vondráček, 1957).

Méry sa rozmnožujú pohlavne, ale v niektorých prípadoch dochádza aj k fakultatívnej partenogéze. V prípade partenogézy sa následne vyskytujú len samičky a dochádza k tomu pri niektorých druhoch *Cacopsylla rara*, *Glycaspis operta*, *Glycaspis atkinsoni* a *Cacopsylla myrtilli* (Hodkinson, 1984; Moore, 1970). Kopuláciu (párenie) mér je možné pozorovať v určitom čase aj voľne v prírode, pričom samec vyhľadáva samicu. Doba párenia závisí na: čase, kedy sa objavujú dospelé jedince; na vývojovom štádiu, ktoré prezimuje a na počte generácii v roku. Po párení nasleduje kladenie vajíčok na rastlinu vhodnú pre určitý druh (Vondráček, 1957).

Často skúmaným javom pri mérach sa stala ich vibračná komunikácia, ktorá bola prvýkrát opísaná v polovici minulého storočia (Ossiannilsson, 1950). Vibračná komunikácia sa stala primárnym komunikačným kanálom medzi jedincami, vyskytujúcim sa takmer vo všetkých čeľadiach v rámci Psylloidea. Méry túto vibračnú komunikáciu (striduláciu) zväčša používajú pri hľadaní partnera a pri výbere partnera prostredníctvom duetu samca a samice, pri ktorom si samec a samica vymieňajú špecifické signály pre pohlavie. Následne je celý proces párenia uľahčený. Pôvodcom volania je zvyčajne samec, a vnímavá samica, tak vydá odpoveď a samec nájde samicu. O mechanizme vytvárania signálu bolo navrhnutých niekoľko hypotéz, v prípade mér je akustický signál vytváraný trením krídel (Wenninger *et al.*, 2009). V dnešnej dobe sa považuje vibračná komunikácia za kľúčový prvok pri špecifickom rozpoznávaní medzi samicami a samcami mér (Avosani *et al.*, 2022; Lubanga *et al.*, 2014).

Méry, tak ako dospelé aj larvy všetkých štádií sa živia pomocou svojich ústnych orgánov, ktoré slúžia k prepichovaniu a saniu na rastlinách. Každý druh mér sa živí saním zväčša na jednom druhu rastlín alebo na príbuzenských skupinách rastlín. Na potravu vyberajú hlavne zelené časti rastlín ako sú listy, listové stopky, stopky kvetov alebo listové pupene. Ich ústne orgány môžu fungovať tak ako na prehĺtanie rastlinnej šťavy, tak aj na slinenie. Profily slinných enzýmov sú zložité a obsahujú proteíny ako oxidoreduktázy, dehydrogenázy, esterázy, astrehalázy, amylázy, lipázy a cytochróm P-450. Napríklad vďaka amylázam méry dokážu prenikať do pletív hostiteľskej rastliny. Méry z rastlinných štiav bohatých na cukry získavajú metabolity, minerálne látky a vodu. Takáto strava je nutrične nevyvážená, neobsahuje esenciálne aminokyseliny, vitamíny a lipidy. Preto sa pre méry dôležitým faktorom stala asociácia s endosymbiotickými mikroorganizmami, ktoré sa nachádzajú v špecializovanom orgáne zvanom mycetóm v tráviacom trakte. Tieto mikroorganizmy dopĺňajú mérám potravu na správny vývoj (Douglas, 2006; Eyer, 1937; Hodkinson, 1973; Sharma *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015; Sharma *et Raman*, 2017; Vondráček, 1957; Woodburn *et Lewis*, 1973).

Sanie dospelých jedincov zvyčajne spôsobuje na hostiteľskej rastline len malé škody na rozdiel od škôd, ktoré sa pripisujú larválnemu štádiu. Predpokladá sa, že by to mohlo súvisieť s degeneráciou mycetómu u dospelých jedincov (Annecke *et Cilliers*, 1963; Richards *et Brooks*, 1958; White, 1970).

Méry sú schopné interagovať s inými organizmami a veľmi dôležitou ekologickou interakciou sa stal mutualizmus. Mutualizmus je možné definovať ako vzájomne prospešnú interakciu medzi jedincami dvoch druhov (Boucher *et al.*, 1982; Bronstein, 1994), pričom sa zvyšuje ich životná úroveň (napr. prežitie, životnosť). Najštudovanejším a najbežnejším prípadom mutualizmu, taktiež známa ako trofobióza, sa pri mérach stala interakcia medzi mravcami a mérami. Niektoré méry vylučujú cez konečník cukornaté exkréty tzv. medovicu. Medovica je komplexná zmes vo vode rozpustných sacharidov (glukóza, sacharóza, fruktóza a ďalšie), aminokyselín, amidov, organických kyselín, alkoholu, auxínov a solí. Napríklad pre mravcov takto vytvorená medovica môže byť veľmi dôležitým zdrojom potravy. Mravce sú na oplátku prospešné pre méry tým, že im poskytujú ochranu pred prirodzenými predátormi a parazitmi (Delabie, 2001; Hackman *et Trikojus*, 1952; Larsen *et al.*, 1992; Shoujje *et al.*, 2015; Styrsky *et Eubanks*, 2007).

3.2 Fytoplazmy, ich interakcie a šírenie

Fytoplazmy patria k veľkej skupine bakteriálnych patogénov, ktoré napádajú rôzne plodiny, stromy a okrasné rastliny sú taktiež zodpovedné za stovky chorôb rastlín a spôsobujú veľké škody. V roku 1967 Doi *et al.* (1967) prvýkrát opisali za použitia elektrónovej mikroskopie prítomnosť malých pleomorfných teliesok pripomínajúcich mykoplazmy v ultratenkých rezoch sitkových elementov floému moruše, ktorá bola infikovaná zakrpatením. V súčasnosti ich zaraďujeme do kmeňa *Tenericutes* a do triedy *Mollicutes* (Bertaccini *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 1998; Trivellone *et Dietrich*, 2021).

V prírode sú fytoplazmy prevažne prenášané prostredníctvom hmyzu z čeľadí *Cicadellidae* a *Psyllidae* a nadčelade *Fulgoroidea*, ktoré sa krmia floémovou šťavou infikovaných rastlín. Z toho dôvodu hostiteľský okruh fytoplazmiem závisí od potravných návykov hmyzích prenášačov (Bertaccini, 2007). Účinnými prenášačmi sa stali hlavne kvôli niekoľkým spoločným vlastnostiam, ku ktorým patrí napríklad ich nedokonalá premena, špecifické kŕmenie na určitých rastlinách, nedeštruktívne kŕmenie alebo ich rozmnožovací a trvalý vzťah s fytoplazmami. Mnohé fytoplazmy prenáša viacero rôznych druhov hmyzu, no niektoré môže prenášať len jeden druh. Avšak taktiež jeden druh dokáže prenášať dva aj viac rôznych fytoplazmiem, pričom jedinec môže byť infikovaný viacerými kmeňmi fytoplazmy. Predpokladá sa, že vzájomný vzťah medzi hmyzom a fytoplazmou vykazuje určitý stupeň špecifickosti (Lee *et al.*, 2000; Weintraub *et Beanland*, 2006).

Interakcie fytoplazmiem s hmyzím vektorom a rastlinným hostiteľom

Fytoplazmy, prenášané vektormi často zaobchádzajú s morfológiou, správaním, či fyziológiou hostiteľa (Weinersmith *et Faulkes*, 2014).

Tieto patogénne baktérie sú schopné napádať organizmy dvoch od seba odlišných ríš, a to rastlín (*Plantae*) a hmyzu (*Animalia*), v ktorých sa dokážu intracelulárne replikovať (Sugio *et al.*, 2011). Niekoľko štúdií, ktoré skúmali vzťah medzi hmyzími vektormi a fytoplazmami zistili, že je veľmi premenlivý a môže mať na fitness vektora negatívne, pozitívne alebo žiadne účinky (Arismendi *et Carrillo*, 2015; Madden *et Nault*, 1983; Queiroz *et al.*, 2016). Pozitívne pôsobenie na vektora uvádza aj Beanland *et al.* (2000), vektory *Macrosteles quadrilineatus* (Forbes, 1885) vystavené fytoplazme žltacky astier žijú dlhšie a kladú viac vajíčok ako vektory, ktoré neboli fytoplazmou infikované.

Fytoplazmová infekcia môže mať rôzne účinky na rôzne druhy vektorov. Tieto rozdielne účinky môžu závisieť od toho, či je daný vektor fytoplazmy primárny alebo sekundárny (Madden *et al.*, 1984), ale aj od výskytu vektora v určitom prostredí. Vplýva na to teplota, kedy infekcia fytoplazmou môže byť pre vektora škodlivá pri nízkych teplotách (Garcia-Salazar *et al.*, 1991).

Pri živočichochoch sa na interakcii medzi hmyzím vektorom a fytoplazmou zúčastňujú membránové proteíny fytoplazmy, nazývané ako antigénové membránové proteíny (Amp). Amp následne tvorí komplex s mikrofilamentami viscerálneho hladkého svalstva, nachádzajúceho sa pri črevnom trakte hmyzu. Celý tento komplex Amp-mikrofilameta súvisí so schopnosťou hmyzích vektorov prenášať fytoplazmy (Suzuki *et al.*, 2006).

Pri rastlinách fytoplazmy infikujú hostiteľov tak, že sa presúvajú cez póry sitkových políčok a takto sa šíria po celom cievnom systéme rastliny (Rudzińska-Langwald *et Kamińska*, 1999). Fytoplazmy v infikovaných rastlinách spôsobujú rozličné príznaky, do toho počítajúc žltacky a zvinutia listov, chlorózy (blednutie listov), malolistosti, proliferácie výhonkov aj koreňov, zakrslosť, virescencie (strata normálnych kvetinových pigmentov a vývoj zelených kvetov), fylodie (vývoj kvetov do listových štruktúr), či odumieranie výhonkov alebo celých rastlín. Príznaky spôsobené fytoplazmami poukazujú na poruchy hormonálnej rovnováhy a funkcie floému hostiteľskej rastliny. Vo všeobecnosti symptómy spôsobené fytoplazmovou infekciou majú jednoznačne škodlivé účinky na rastliny, aj keď niektoré rastlinné druhy sú odolné voči fytoplazmovým infekciám a môžu byť asymptomatické alebo môžu vykazovať len mierne symptómy. Neprejavenie symptómov môže byť zapríčinené nepriaznivými podmienkami prostredia, pri zvýšenej teplote napríklad v púštnych oblastiach, alebo v oblastiach charakterizovaných semitropickými podmienkami (Al-Ghaithi *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2000; Soufi *et Komor*, 2014). Ako nešpecifické reakcie na stres vyvolaný infekciou fytoplazmy, bola pri rastlinách taktiež zaznamenaná zvýšená produkcia stresových proteínov (Carginale *et al.*, 2004) alebo zvýšenie podielu polyfenolických látok či nadprodukcia peroxidu vodíka (Musetti *et al.*, 2000; 2004).

Šírenie fytoplazmy pomocou hmyzích vektorov

Keďže fytoplazmy patria k obligátnym parazitom, tak svoj životný cyklus nemôžu dokončiť bez využitia vhodného hostiteľa. Zvyčajne sú prenášané zo slín nakazených hmyzích vektorov do floému rastlín počas kŕmenia. K prenosu fytoplazmy dochádza v troch krokoch nazývaných

ako: obdobie akvizičného sania, latentné obdobie a obdobie inokulácie (Nault, 1997; Weintraub *et Beanland*, 2006). Prenos fytoplazmy hmyzím vektorom znázorňuje obrázok 1.

1. obdobie akvizičného sania

Počas procesu akvizičného sania sa hmyz živiaci floémom infikovanej rastliny stáva infekčným tým, že pohlcuje fytoplazmu (Nault, 1997). Akonáhle baktérie preniknú do črevného lumenu hmyzu, tak napadnú a pravdepodobne sa rozmnožia v črevných epitelových bunkách a v príľahlých svalových bunkách, ktoré obklopujú črevné bunky v mieste hemolymfy. Postupne sa tieto baktérie presúvajú do hemolymfy, z ktorej sú schopné infikovať rôzne iné orgány a tkanivá hmyzu vrátane slinných žliaz. Bunky slinných žliaz obsahujú veľké vakuoly, v ktorých sa fytoplazmy hromadia (Fletcher *et al.*, 1998; Hogenhout *et al.*, 2008; Lherminier *et al.*, 1990; Wayadande *et al.*, 1997).

Účinnosť akvizičného sania súvisí s dĺžkou kŕmenia potrebnej na získanie fytoplazmy (Rondon *et Oppedisano*, 2020). Podľa doterajších informácií stačí na získanie fytoplazmy v priemere niekoľko hodín, aj keď dlhšie kŕmenie vedie k vyššej účinnosti získania. Minimálny čas na získanie fytoplazmy prenášanej vektorom *Circulifer tenellus* je 5 min (Golino *et al.*, 1987). Sanie pri mere trnkovej (*Cacopsylla pruni*) je odhadované na 2 až 4 dni (Carraro *et al.*, 2001).

Predpoklad o tom, že larvy majú väčšiu šancu získať fytoplazmu na základe dlhšieho stabilného kŕmenia potvrdil Murrall *et al.* (1996), kde larvy *Macrostelus quadrilineatus* boli úspešnejšie pri získavaní fytoplazmy.

2. latentné obdobie

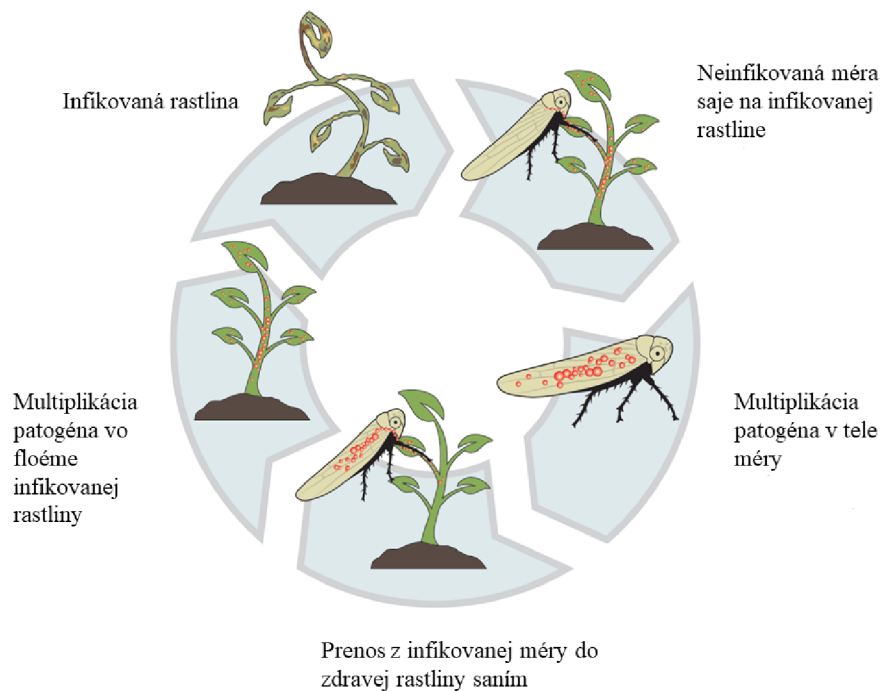
Latentné obdobie, niekedy tiež nazývané inkubačné obdobie, predstavuje časový interval od počiatočného nadobudnutia fytoplazmy do úspešného prenosu fytoplazmy na rastliny. Tento čas je potrebný na zmnoženie a na kolonizáciu fytoplazmy v tele hmyzu. Pokiaľ by k zmnoženiu a kolonizácii nedošlo, tak by sa hmyz stal hostiteľom, ktorý by nebol spôsobilý fytoplazmu prenášať (Rondon *et Oppedisano*, 2020; Weintraub *et Beanland*, 2006).

Čo sa týka dĺžky tohto obdobia, tak trvá približne od 20 do 80 dní a je pravdepodobne ovplyvňovaná rozmnožovaním fytoplazmy vo vektore v závislosti od teploty, pri vyšších teplotách je latentné obdobie kratšie ako pri tých nižších (Murrall *et al.*, 1996). Taktiež latentné obdobie ovplyvňuje dĺžka akvizičného sania, kde možno predpokladať, že dlhšie akvizičné sanie a tým aj množstvo nasatej fytoplazmy, môže skrátiť dĺžku latentného obdobia (Alivizatos *et Markham*, 1986).

3. obdobie inokulácie

Obdobie inokulácie zodpovedá času, kedy dochádza k prenosu fytoplazmy na zdravú rastlinu hmyzím vektorom (Rondon *et* Oppedisano, 2020). Hmyz v tomto čase vstrekuje fytoplazmu priamo do sitkových rúrok zdravej rastliny (Bosco *et* Tedeschi, 2013). V prírode sa stretávame len s prenosom fytoplazmy prostredníctvom dospelých jedincov, keďže larvy nie sú schopné presunu z infikovanej rastliny na zdravú (Bosco *et* Marzachi, 2016).

Na dostatočný prenos fytoplazmy hmyzím vektorom do rastliny je potrebné, aby obdobie inokulácie trvalo niekoľko hodín, dlhší čas vedie k vyššej účinnosti prenosu (Bressan *et al.*, 2007). Vývoj symptómov na hostiteľskej rastline môže po inokulácii trvať až 8 týždňov (Greber *et* Gowanlock, 1979).



Obrázok 1: Prenos fytoplazmy hmyzím vektorom (Rondon *et* Oppedisano, 2020).

3.3 Méry na území Českej republiky

Fauna mér na území Českej republiky je pomerne dobre známa, keďže skúmanie tejto skupiny počalo už koncom 19. storočia (Stehlík *et* Heiss, 2000; Vondráček, 1957). Čo sa týka rozšírenia

v jednotlivých regiónoch, tak je značne nerovnomerné (Malenovský *et* Lauterer, 2012). Pomerne veľa údajov o výskyte mér je najmä z južnej a západnej Moravy (Čermák *et* Lauterer, 2008; Lauterer, 1993, 1999) a severných Čiech (Lauterer, 2001; Malenovský, 2006). Väčšina ostatných častí Českej republiky ostáva málo preskúmaná.

V Českej republike je známych približne 124 druhov mér, pričom 53 druhov je zapísaných v červenom zozname ohrozených druhov (Lauterer *et* Malenovský, 2005). K najznámejším rodom sa zaraďuje rod *Cacopsylla*, ktorý patrí medzi najvýznamnejších hmyzích škodcov ovocných stromov a vektorom fytoplaziem (Tadeschi *et al.*, 2006), za významné vektorové druhy sú v ČR považované napríklad *Cacopsylla picta* (Förster, 1848), *Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763), *Cacopsylla pyrisuga* (Förster, 1848), *Cacopsylla pyri* (Linné, 1758) a *Cacopsylla melanoneura* (Förster, 1848) (Čermák *et* Lauterer, 2008). A taktiež *Cacopsylla mali* (Schmidberger, 1836) patrí k významným škodcom v záhradách, či ovocných sadoch, avšak fytoplazmy neprenáša (Kocourek *et al.*, 2015).

3.4 *Cacopsylla melanoneura* (Förster, 1848)

Cacopsylla melanoneura bola prvýkrát opísaná Försterom v roku 1848. Patrí k oligofágnyim druhom, je schopná sať z viacerých rastlinných druhov. V minulosti bol za hlavnú živnú rastlinu považovaný Hloh obyčajný (*Crataegus oxyacantha* L.). Momentálne sa k ďalším živným rastlinám zaraďujú napríklad stromy rodu *Malus*, *Mespilus* alebo príležitostne *Pyrus*. (Janik *et al.*, 2020; Ouvrard, 2015b; Vondráček, 1957).

Cacopsylla melanoneura je univoltinný druh, počas jedného roka má iba jednu generáciu a je schopný prezimovať v dospelom štádiu na rastlinách, hlavne na ihličnanoch. Na konci zimy, medzi koncom januára a polovice marca, dospelí jedinci migrujú späť na hostiteľské rastliny, kde prebieha kopulácia, kladenie vajíčok a vývoj lariev. Každá samica je schopná vyliahnúť okolo 200 vajíčok, čo je v porovnaní s *Cacopsylla picta* o 40 vajíčok viac. Vývoj lariev trvá približne štyri až päť týždňov (Čermák *et* Lauterer, 2008; Janik *et al.*, 2020; Tadeschi *et al.*, 2012). Samec meria 2,52 – 3,30 mm, samica je o niečo väčšia a má zvyčajne 2,95 – 3,30 mm (Ossianilsson, 1992). Základnou farbou jej hlavy a hrudi je svetlo žltá a zadok má bežne čiernohnedú farbu (Vondráček, 1957).

Nie je jasné, či je *Cacopsylla melanoneura* efektívnym vektorom fytoplazmy '*Candidatus* Phytoplasma mali' a tým aj zdrojom šírenia choroby proliferácie jabloní v strednej Európe,

keďže v Taliansku *C. melanoneura* bola preukázaná ako vektor tejto fytoplazmy (Malagnini *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2002). Avšak v Nemecku táto méra nebola preukázaná ako jej významný vektor (Mayer *et al.*, 2009).

3.5 Príznaky choroby spôsobenej fytoplazmou '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Proliferácia jabloní je rozšírená v regiónoch pestovania jablák a bola preukázaná v Rakúsku, Belgicku, Bosne a Hercegovine, Bulharsku, Chorvátsku, Českej republike, Fínsku, Francúzsku, Nemecku, Maďarsku a Taliansku, Nórsku, Poľsku, Rumunsku, Srbsku, Slovinsku, Španielsku, Švajčiarsku, Holandsku a Turecku (Tedeschi *et al.*, 2013).

Infekcia fytoplazmou proliferácie jablone vyvoláva širokú škálu symptómov (viď obrázok 2). K špecifickým symptómom patrí metlovitosť (zhluk zakrpatených slabých výhonkov) a u niektorých kultivaroch jabloní aj zväčšené a zúbkaté palisty. K nešpecifickým symptómom sa zaraďuje predčasné začervenanie listov, pri niektorých odrodách jablák sa môže vyskytnúť chloróza pred zberom, skoré pučanie púčikov na jar. Ďalším nešpecifickým príznakom sú malé chuťovo nevýrazne a menej sfarbené plody s dlhými stopkami. Menej viditeľné sú malformácie koreňov (Blatný, 1963; Bovey, 1963; Janik *et al.*, 2020; Schmid, 1975). Pri niektorých druhoch rodu *Malus* spp. sa vyskytujú deformácie listov, a taktiež ich zvinutie (Kartte *et Seemüller*, 1988).



Obrázok 2: Porovnanie zdravého (A) a výhonku so symptómami proliferácie jablone (B-D) (Janik *et al.*, 2020).

3.6 Kontrola fytoplazmových ochorení a vektorov

Vzhľadom k tomu, že fytoplazmy napádajú ovocné dreviny, tak majú významný hospodársky vplyv. Priemerné ročné ekonomické straty spôsobené chorobou proliferácie jablák boli v Nemecku vyčíslené na 25 mil. eur a v Taliansku to robí až 100 mil. eur. Tieto straty vznikajú v dôsledku tvorby abnormálneho keru, či produkcie menších plodov bez chuti (Strauss, 2009).

Z toho dôvodu je kontrola fytoplazmových ochorení dôležitá a pozostáva hlavne v ošetrovaní insekticídmi proti hmyzím prenášačom, a taktiež v zaobstaraní, aby sa vektory nešírili do nových oblastí. Insekticídy pôsobia tak ako na potlačenie populácie vektora, tak aj na zabránenie prenosu. Potlačenie populácie vektora sa dosahuje ľahšie, keďže väčšina vektorov fytoplaziem je citlivá na rôzne účinné látky, napríklad neonikotinoídy. Zabránenie prenosu sa už dosahuje ťažko, a to z dôvodu, že prenos fytoplazmy prebieha rýchlejšie, ako sú insekticídy schopné pôsobiť (Bosco *et* Marzachi, 2016; Weintraub *et* Wilson, 2010).

Aplikácia insekticídov je účinná, ale nepôsobí špecificky len na méry, ale aj na iných zástupcov hmyzu ako sú napríklad včely, a preto sú hľadané alternatívne stratégie (Desneux *et al.*, 2007). Odporúčané je využitie ďalších ekologickejších postupov ako sú paste s lákavými zložkami ako je Beta-karyofylén alebo lepkavé dosky (Eben *et* Gross, 2013).

Na kontrolu vektorov je možné využiť aj ich predátorov, či parazitov, pričom predátori mér sú veľmi málo známi. Detailne popísaní sú len pri hospodársky významných druhoch, ako sú méry hrušiek *Cacopsylla pyri*, *C. pyricola* a *C. pyrisuga*; méry jabloní a eukalyptových psyllidách z podčeleďade Spondyliaspidinae (Jerinic-Prodanovic *et* Protić, 2013). K regulácii výskytu mér sa využívajú niektoré druhy z čeľade *Anthocoridae* (leskličkovité), napríklad *Anthocoris nemoralis*, ktorí sú považovaní za špecializovaných predátorov živiacich sa prednostne mérami a mšicami. Problémom je, že tento hmyz nie vždy migruje do sádov dostatočne skoro a v dostatočnom množstve. Taktiež zástupcovia čeľadi *Coccinellidae* (lienkovité), *Chrysopidae* (zlatoočkovité), *Formicidae* (mravcovité) a pavúky, by mali prispievať k znižovaniu veľkosti populácie mér v sadoch (Hill, 2009; Solomon *et al.*, 2000). Na kontrolné účely sú títo predátori menej vhodní, keďže nie sú až tak špecifickí a sú málo synchronizovaní s mérami (Burckhardt, 1994). K vtákom, ktorí sa živia mérami patrí napríklad červienka (*Erihacus* spp.), penica (*Sylvia* spp.), brhlík (*Sitta* spp.), lastovičky (*Hirundo* spp.) ale ich cielené využitie v ochrane sádov nie je prakticky možné (Vondráček, 1957).

Rôzne druhy parazitov sú spojené s konkrétnym druhom a sú schopné znižovať veľkosť prirodzenej populácie mér (Weintraub *et* Wilson, 2010). Parazity mér nachádzame pomedzi

Diptera (dvojkřídlovce) - čeľaď *Cecidomyiidae* (byľomorovitě) a z radu Hymenoptera (blanokřídlovce) - čeľade *Encyrtidae*, *Eulophidae*, *Eupelmidae*, *Eurytomidae*, *Pteromalidae*, *Thysanidae*, *Torymidae*, *Cynipidae*, *Braconidae*, *Ceraphronidae* a *Platygasteridae*. Zástupci rodu *Endopsylla* parazitujú na dospelých mérach, zástupcovia z radu Hymenoptera napádajú larvy mér s výnimkou rodu *Sectiliclava cleone*, ktorá parazituje na dospelých *Psylla melanoneura* (Robinson, 1961a,b,c; Jensen, 1957). Paraziti napádajúci vajíčka nie sú známi. Dôležitá je synchronizácia životných cyklov méry a parazita, preto napríklad paraziti lariev kladú vajíčko v blízkosti nôh larvy méry a larvy parazita sa následne živia zvonka na spodnej strane larvy (Hodkinson, 1974; Martin, 2010).

Zabrániť šíreniu vektorov a fytoplaziem napomáha aj odstraňovanie napadnutých rastlín, pričom sa rastliny odstraňujú buď úplne alebo sa odstraňujú len symptomatické výhonky. Taktiež účinná je aj výsadba rastlín, ktoré sú odolné voči fytoplazmám alebo odrádzajú hmyzie vektory (Weintraub *et* Wilson, 2010).

3.7 Molekulárna detekcia mér

V súčasnej dobe je identifikácia mér v teréne podľa morfológických znakov veľmi časovo náročná a vyžaduje si špecializované odborné znalosti. V prípade dospelého jedinca, samca, je možné spoľahlivo určiť taxonomickú kategóriu až do druhu, čo pri samiciach je ťažšie a dajú sa spoľahlivo určiť do rodu. Identifikácia vajíčok, či larválnych jedincov vzhľadom k nedostatku morfológických znakov, je značne zložitá. Problematická môže byť aj determinácia jedincov, ktorí sa poškodili počas odchyty alebo pri odstraňovaní z lepových dosiek. Z toho dôvodu sa na rozlíšenie druhov vyvíjajú rôzne molekulárne metódy, keďže väčšina z týchto metód je založená na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) a štúdiu rôznych génov. Odlišné oblasti DNA môžu byť užitočné pre taxonomické štúdie vďaka tomu, že poukazujú na vysoké alebo nízke úrovne variability. Pričom za jeden z najdôležitejších génov pre identifikáciu živočíšnych druhov je považovaný mitochondriálny gén kódujúci cytochróm c oxidázu (Behura, 2006; Hebert *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 2014; Suh *et* Choi, 2020).

Rýchle a presné metódy sú nevyhnutné na monitorovanie vektorov, aby následne bolo možné použitie priamych metód na ochranu rastlín, či na obmedzenie šírenia ochorení spôsobených hmyzím vektorom (Oettl *et* Schlink, 2015).

DNA barcoding

DNA barcoding predstavuje novú metódu založenú na DNA, ktorá sa využíva na identifikovanie známych či neznámych druhov na základe druhovo špecifických rozdielov v krátkych oblastiach ich DNA. Pri hmyze je to zvyčajne 658 bp dlhý fragment mitochondriálnej cytochróm c oxidázy (Jalali *et al.*, 2015).

Táto technika zahŕňa odchyt jedincov v teréne, izoláciu DNA, amplifikáciu konkrétneho génu za použitia univerzálnych primerov, sekvenovanie získaného fragmentu a bioinformatickú analýzu sekvencií na identifikáciu charakteristických motívov. Konečným cieľom je vytvorenie digitálnych a spoľahlivých DNA barkódov, ktoré sú použiteľné na získanie informácií o taxonomickom zaradení jedincov prostredníctvom algoritmov umožňujúcich porovnávanie sekvencií DNA so sekvenciami dostupnými v špecializovaných databázach ako sú napríklad Barcode of life data system (BOLD) či GenBank. Na získanie správnej identifikácie je potrebné, aby v online databázach už existovali sekvencie na porovnanie. Z toho dôvodu je potrebné dané databázy rozširovať (Antil *et al.*, 2023; Rolo *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2019).

DNA barcoding výskumníci používajú čoraz častejšie, pretože sa sekvencie dajú získať rýchlo, ľahko a pre determináciu jedincov nie je potrebné poznať špecifické morfológické znaky. Úspešné využitie DNA barcodingu bolo u mér r. *Cacopsylla* preukázané napríklad pri identifikácii často nesprávne determinovanej méry hruškovej (*Cacopsylla pyri*) (Cho *et al.*, 2020).

RFLP-polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov

Veľmi populárnou technikou pre genetickú analýzu sa stala aj metóda RFLP, ktorá sa používa na detekciu ako vnútrodruhovej, tak aj medzidruhovej variability. RFLP spočíva v troch základných krokoch, pričom v prvom kroku prebieha amplifikácia cieľového fragmentu, variabilného génu. V ďalšom kroku nasleduje štiepenie amplifikovaného fragmentu vhodným restričným enzýmom a vytvorenie restričných fragmentov s rôznou veľkosťou. Posledný krok zahŕňa analýzu vytvorených fragmentov, zistenie restričného profilu pomocou gélovej elektroforézy, ktoré sa porovnávajú so známymi štandardmi (Rasmussen, 2012).

V porovnaní s inými metódami je metóda RFLP technicky jednoduchá, menej náročná na čas a má nízke náklady na analýzu. Metóda sa osvedčila pri identifikácii dospelých jedincov a lariev, napríklad dvoch hlavných vektorov (*C. melanoneura*, *C. picta*) fytoplazmy

'*Candidatus Phytoplasma mali*' spôsobujúcu proliferáciu jabloní, pričom pri identifikácii lariev je metóda užitočná na predpovedanie populačnej hustoty vektora v nasledujúcom roku (Oettl *et Schlink*, 2015).

AFLP-polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov

Jedná sa o modifikovanú formu metódy RFLP (Loxdale *et Lushai*, 1998), ktorá je založená na PCR amplifikácii restriktčných fragmentov získaných z genomickej DNA za použitia obmedzeného súboru generických primerov (Vos *et al.*, 1995). Táto technika celkovo pozostáva z niekoľkých krokov. Prvým krokom je štiepenie genomickej DNA pomocou dvoch restriktčných enzýmov, aby sa vytvorili fragmenty s lepivými koncami. Na tieto konce sa následne napájajú adaptéry a s pomocou adaptér špecifických primerov prebehne amplifikácia restriktčných fragmentov. Veľkosť amplifikovaných fragmentov je potom detekovaná pomocou elektroforetickej separácie. V minulosti sa používali na detekciu rádioaktívne značené primery a gélová elektroforéza, no momentálne sa používajú fluorescenčne značené primery a kapilárna gélová elektroforéza (Meudt *et Clarke*, 2007; Paun *et Schönswetter*, 2012; Rasmussen, 2012).

AFLP sa využíva k rôznym účelom, napríklad pri hodnotení genetickej variability v rámci druhu, alebo medzi príbuznými druhmi, či na tvorbu genetických máp. Výhodou tejto metódy je, že nie sú potrebné predchádzajúce informácie o cieľovom genóme. Taktiež je výhodná ako vo vysokej reprodukovateľnosti, tak aj v citlivosti na detekciu polymorfizmov na úrovni sekvencie DNA (Paun *et Schönswetter*, 2012).

RAPD-náhodná amplifikácia polymorfnej DNA

RAPD je metódou, ktorá zahŕňa PCR a umožňuje detekovať veľké množstvo polymorfizmov v rámci genomickej DNA v krátkom časovom období. Táto metóda využíva menej špecifické primery, ktoré amplifikujú viaceré ľubovoľné oblasti genómu (Skoda *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 1990). Následne je možné takto amplifikovanú DNA rozdeliť podľa veľkosti pomocou gélovej elektroforézy. Výsledné rozdiely v takto získaných DNA profiloch predstavujú genetický polymorfizmus medzi jednotlivcami, či medzi populáciami (Hadrys *et al.*, 1992).

Výhodou tejto metódy je, že umožňuje identifikovať druhy v akomkoľvek štádiu životného cyklu, keďže DNA zostáva počas života nezmenená. Neznáme vajíčka či larvy sa dajú ľahko identifikovať porovnávaním vytvorených profilov s profilmi známych dospelých jedincov (Ablett, 1994). Nevýhodou je, že sa často vytvára veľké množstvo produktov a nie je ľahké ich

následne rozoznať. Potom na identifikovanie slúžia len tie najviditeľnejšie produkty (Roderick, 1996).

SSRs-mikrosatelity

Mikrosatelity patria ku krátkym opakujúcim sa sekvenciám vyskytujúcich sa v mnohých organizmoch, do toho počítajúc hmyz (Heymer, 1994). Pri tejto metóde sa mikrosatelity amplifikujú za použitia PCR s primermi, ktoré lemujú konkrétnu oblasť opakovania. Na vizualizáciu výsledkov amplifikácie sa taktiež, ako v predchádzajúcich metódach využíva elektroforetická separácia. Táto metóda sa využíva hlavne vtedy, keď iné metódy vykazujú nedostatočnú variabilitu (Roderick, 1996).

Príkladom aplikácie SSRs je výskum *Diaphorina citri*, pričom sa SSR markery úspešne využívajú pri populačných a fylogeografických štúdiách. Výsledky pomáhajú vytvárať vhodné stratégie monitorovania výskytu tohto poľnohospodárskeho škodcu (Boykin *et al.*, 2007).

3.8 DNA markery na identifikáciu organizmov

Mitochondriálna DNA je považovaná za užitočný nástroj na identifikáciu organizmov, vďaka jej jednoduchej štruktúre. Je to malá, kruhová DNA, ktorá sa dedí zväčša po matke. Obsahuje obvykle 37 génov, vrátane 13 génov kódujúcich proteíny, 22 génov transferovej RNA a dvoch génov ribozomálnej RNA. Pre identifikáciu organizmov pomocou mitochondriálnej DNA sa zväčša využívajú oblasti génov pre cytochrom c oxidázu (podjednotky I a II) a 16S rRNA (Lessinger *et al.*, 2000).

Cytochrom c oxidáza podjednotka I (COI)

Cytochrom c oxidáza podjednotka I (COI) je gén mitochondriálnej DNA, ktorý kóduje proteín napomáhajúci pri bunkovom dýchaní. Oblasť o dĺžke približne 650 párov báz má nízku sekvenčnú variabilitu v rámci druhu, ale vysokú medzi druhmi (Aly, 2014). Preto sa gén COI univerzálne využíva pri identifikácií či už hmyzu, mäkkýšov, rýb, tak aj obojživelníkov, či cicavcov. Avšak pri protistoch, hubách a rastlinách je účinnosť COI pri identifikácii organizmov problematická, keďže napríklad niektoré druhy protistov nemajú mitochondriálnu DNA (Imtiaz *et al.*, 2017).

Cytochrom c oxidáza podjednotka II (COII)

Cytochrom c oxidáza podjednotka II je druhou podjednotkou cytochróm c oxidázy, ktorá sa taktiež dá použiť pri identifikácii druhov vďaka relatívne vysokému stupňu variability. Avšak problémom pri identifikácii organizmov na základe COII je nízky počet záznamov alebo vytvorených databáz, keďže na správne identifikovanie je potrebné porovnanie sekvencie s overenou referenčnou DNA (Guo *et al.*, 2010).

16S rRNA

Sekvencie mitochondriálnej ribozomálnej RNA sú taktiež používané na fylogenetické štúdie, pričom 16S rRNA sa používa na identifikáciu organizmov na úrovni čeľade či rodu. Rovnako ako pri COII je aj tu problém získať taxonomickú identifikáciu na úrovni druhu, keďže COI je vhodnejší vzhľadom na zavedené referenčné databázy a známe taxonomické rozlíšenie tohto markera. Avšak v prípade budúceho vytvorenia referenčných databáz, by sekvencie 16S rRNA mohli byť vhodnou konkurenciou COI (Elbrecht *et al.*, 2016).

Iné markery

K ďalším markerom na identifikáciu organizmov patria napríklad mitochondriálny gén pre cytochrom b (mt-CYTB) alebo gény pre NADH dehydrogenázy (Tobe *et al.*, 2009), alebo z jadrových génov elongačný faktor 1 α (Simon *et al.*, 2010). Za jeden z možných kandidátnych génov je považovaná aj vnútorná transkribovaná oblasť medzerníka 2 jadrovej ribozomálnej DNA (ITS2 oblasť), pretože má množstvo výhodných vlastností, ako je dostupnosť konzervovaných oblastí na navrhovanie univerzálnych primerov, jednoduchosť amplifikácie a dostatočná variabilita ITS2 na rozlíšenie aj blízko príbuzných druhov (Yao *et al.*, 2010).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

V experimentálnej časti bakalárskej práce bolo testovaných 32 jedincov méry *C. melanoneura* (Förster, 1848), významného vektora fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*'. Méry boli odchytené v troch lokalitách na južnej Morave, Lednice, Velké Němčice a Velké Bílovice, v rokoch 2006 a 2022. Bližšie informácie o lokalite, pohlaví, dátume odchyty a označenia vzorky sú uvedené v tabuľke 1. Méry po odchyte boli identifikované a uskladnené v 96% etanole pri teplote -20°C.

Tabuľka 1: Zoznam analyzovaných jedincov *C. melanoneura*

Lokalita	Označenie vzorky	Pohlavie	Dátum odchyty
Lednice	495/5-6	samec	29.5.2006
Lednice	495/4; 496/7-10	samec	13.6.2006
Lednice	497/1-8; 498/1-8	samica	28.4.2022
Velké Němčice	495/1,3; 496/1,2,5,6	samec	29.5.2006
Velké Bílovice	495/2; 496/3,4	samica	18.4.2006

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Amresco, kat. č. 0710-500G)
- Deionizovaná voda
- Ethidium bromide (Biotium, kat. č. 40042)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, kat. č. 41002)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0243)
- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0323)
- Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide), 100 mg (Invitrogen, kat. č. H1398)
- MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline, kat. č. BIO-21106)
- MyTaq™ Red Reaction Buffer 5x (Bioline, kat. č. BIO-21106)
- Primery (Generi-Biotech)

Použité súpravy

- BigDye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, kat. č. 4336697)
- FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Geneflow, kat. č. FG-91302)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740609.50)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, kat. č. 51106)

Použité roztoky a ich príprava

- 50x TAE (Tris, Acetate, EDTA): V 800 ml dH₂O za stáleho miešania rozpustiť 242 g Tris base, pridať 57,1 ml ľadovej kyseliny octovej a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplniť dH₂O do 1 000 ml.
- 10x TNE (Tris, NaCl, EDTA): V 800 ml dH₂O za stáleho miešania rozpustiť 12,11 g Tris base, pridať 3,72 g EDTA a 116,89 g NaCl, pH upraviť pomocou koncentrovanej HCl na 7,4 a objem doplniť do 1 000 ml dH₂O.

4.3 Použité prístroje a zariadenia

- Centrifúga Biofuge pico (Heraeus)
- Centrifúga Prism™ mini (Labnet)
- Centrifúga Spectrafuge Mini (Labnet)
- Dokumentačný systém G:BOX (Syngene)
- Dri-Block Heater DB-2D (Techne)
- Elektroforetická komora HU10 MINI (Scie-Plas)
- Fluorometer DyNa Quant 200 (Hofer)
- Laminárny box PV-100 (Telstar)
- Ručný homogenizátor (Kimble)
- Spektrofotometer Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
- Sterilné mikrohomogenizátory (Scienceware)
- Thermocycler T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- UV-transluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Váhy EK 200G (A&D Engineering)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)
- Výrobník ľadu F100 Compact (Icematic)
- Zdroj rovnosmerného prúdu MP-250V (Major Science)

4.4 Použité metódy

4.4.1 Izolácia DNA

Celková DNA z mér *Cacopsylla melanoneura* bola vyizolovaná pomocou QIAamp DNA Blood Mini Kitu metódou adsorpcie na silikátovú membránu. Pričom jedinec bol premiestnený do 1,5ml mikroskúmavky s 180 µl ATL roztoku a jedinec bol rozdrvený mikrohomogenizátorom. Do mikroskúmavky so zhomogenizovaným materiálom bolo pridaných 20 µl proteínázy K, skúmavka bola premiešaná prevrátením skúmavky. Po premiešaní mikroskúmavka s materiálom bola inkubovaná pri 56°C po dobu 15 min v suchom kúpeli. Do mikroskúmavky bolo pridaných 200 µl pufru AL a bola premiešaná vortexovaním do dobu 15 s. Na odstránenie kvapiek z viečka bola mikroskúmavka krátko zcentrifugovaná. Do mikroskúmavky bolo pridaných 200 µl 96% etanolu. Mikroskúmavka bola zvortexovaná po dobu 15 s a opäť krátko zcentrifugovaná. Celý objem prenesený do QIAamp spin kolónky, ktorá bola umiestnená v 2 ml zbernej skúmavke. Následne prebehla centrifugácia 1 min pri 8 000 rpm. Filtrát bol odstránený a kolónka bola vrátená do skúmavky. Do kolónky bolo napipetovaných 500 µl pufru AW1 a prebehla centrifugácia 1 min pri 8 000 rpm. Filtrát bol odstránený a kolónka bola vrátená do skúmavky. Do kolónky bolo napipetovaných 500 µl pufru AW2 a prebehla centrifugácia 4 min pri 13 000 rpm. Filtrát bol odstránený a kolónka bola vrátená do skúmavky. Následne bola kolóna zcentrifugovaná ďalšiu 1 min pri 13 000 rpm. Zberná skúmavka s filtrátom bola vyhodená do odpadu a QIAamp spin kolónka bola premiestnená do čistej 1,5ml elučnej skúmavky. Na povrch kolónky bolo napipetovaných 50 µl destilovanej vody a zmes bola inkubovaná v izbovej teplote po dobu 1 min. Po inkubácii prebehla centrifugácia 1 min pri 1 800 rpm a následne 1 min pri 11 000 rpm. Koncentrácia a kvalita vyizolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky. Vyizolovaná DNA bola uchovaná pri teplote -20°C.

4.4.2 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Bola prevedená amplifikácia fragmentu v oblasti cytochróm c oxidázy podjednotky I pomocou MyTaq™ DNA polymerázy, pričom bola vyizolovaná DNA použitá ako templát. Na amplifikáciu boli použité primery CPF4 (5'-TAAGA ACTA ACCATAAGATTATCGG-3') a CPR4 (5'-CACTTCAGGGTGTCCAAAGAATC-3') podľa Kang *et al.* (2012), očakávaná veľkosť produktu bola 707 bp.

PCR reakčná zmes pozostávala z pufru, sterilnej vody, primerov a MyTaq™ DNA polymerázy, jej zloženie je uvedené v tabuľke 2. Táto reakčná zmes bola pripravená v objeme podľa počtu vzoriek. Celý proces prípravy vzoriek na PCR prebiehal na ľade v sterilnom laminárnom boxe. Po príprave bola reakčná zmes rozpipetovaná do 0,2ml mikroskúmaviek po 24 µl. Do každej mikroskúmavky bolo následne pridaných po 1 µl vyizolovanej DNA. Do termocykléru boli vložené mikroskúmavky s objemom 25 µl. PCR amplifikácia prebehla za podmienok uvedených v tabuľke 3. Výsledné PCR produkty boli uskladnené pri teplote -20°C.

Tabuľka 2: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Položka	Koncentrácia pracovného roztoku	Pipetovaný objem [µl] na 1 test
Pufer	5x	5,00
Voda		18,30
Forward primer	20 pmol · µl ⁻¹	0,25
Reverse primer	20 pmol · µl ⁻¹	0,25
MyTaq DNA polymeráza	5 U · µl ⁻¹	0,20
Celkom		24,00
Objem reakcie		25,00

Tabuľka 3: Podmienky PCR amplifikácie s použitím primerov CPF4/CPR4

Fáza	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	95	180	1
denaturácia	95	30	
nasadenie primerov	50	30	39
elongácia	72	60	
konečná elongácia	72	300	1

4.4.3 Elektroforetická separácia

PCR produkty boli následne detekované pomocou elektroforetickej separácie v 1% agarózovom géle. Zásobný roztok 1% agarózového gélu bol prichystaný navážením a rozpustením 3 g agarózy v 300 ml 1x TAE pufru. Takto pripravený zásobný roztok bol zahriaty v mikrovlnnej rúre. Zásobný roztok bol buď rovno použitý alebo uchovaný pri teplote približne 4°C v chladničke. Pri príprave gélu bolo odliatych 50 ml a pridaných 2,5 µl farbiva GelRed Nucleic Acid Stain. Zmes bola poriadne premiešaná a preliata do vopred pripravenej elektroforetickej vaničky s vloženým hrebienkom. Po stuhnutí bol gél prevrstvený 1x TAE pufrom a hrebienok bol vybratý. Na určenie veľkosti PCR produktov bolo do prvej jamky napipetovaných 1,5 µl štandardu molekulovej hmotnosti GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder. Do nasledujúcich jamiek bolo napipetovaných po 5 µl PCR produktu. Elektroforetická separácia PCR produktu prebiehala pri 80 V a trvala približne po dobu 30 – 40 min. Gél bol po dokončení separácie vyhodnotený pomocou UV-transluminátoru a dokumentačného systému G:BOX, Syngene.

4.4.4 Izolácia PCR produktov

Izolácia PCR produktov z gélu za použitia FastGene Gel/PCR Extraction Kitu

FastGene Gel/PCR Extraction Kit bol použitý na izoláciu PCR produktov s nízkou koncentráciou. Prvým krokom pri izolácii PCR produktu z gélu bola príprava gélu, kde 75 ml 1% agarózového gélu v 1x TAE pufru bolo zmiešaných s 4 µl ethidium bromidu. Takto pripravená zmes bola dôkladne premiešaná a preliata do vopred pripravenej elektroforetickej vaničky s vloženým hrebienkom. Po stuhnutí bol gél prevrstvený 1x TAE pufrom. Do prvej jamky bolo napipetovaných 1,5 µl štandardu molekulovej hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. Do nasledujúcich jamiek bol napipetovaný PCR produkt. Elektroforetická separácia prebiehala po dobu 30 – 40 min pri 80 V.

Po elektroforetickej separácii boli PCR produkty odpovedajúcej veľkosti vyrezávané sterilným skalpelom a umiestnené do vopred zvážených 1,5ml mikroskúmaviiek. Bola zistená váha gélu v mikroskúmavke a ten bol zmiešaný s 500 µl GP1 pufru podľa objemového pomeru 300 mg gélu : 500 µl GP1 pufru. Mikroskúmavky boli inkubované 10 min pri 55°C v suchom kúpeli pokým sa gél kompletne nerozpustil. Počas inkubácie boli mikroskúmavky niekoľkokrát jemne premiešané prevrátením. Do izolačnej kolónky bolo napipetovaných 800 µl zmesi a bola

centrifugovaná 30 s pri 13 000 rpm, následne bol odstránený filtrát. Pokiaľ bolo rozpustených viac ako 800 µl tak bol predošlý krok zopakovaný. Do kolónky bolo napipetovaných 600 µl GP2 pufru a kolónka bola zcentrifugovaná po dobu 30 s pri 13 000 rpm a filtrát bol opäť odstránený. Na vysušenie bola prázdna kolónka v zbernej skúmavke zcentrifugovaná po dobu 2 min pri 13 000 rpm. Kolónka bola umiestená do novej 1,5ml mikroskúmavky a na membránu kolónky bolo napipetovaných 30 µl destilovanej vody. Kolónka bola inkubovaná pri izbovej teplote po dobu 2 min a následne bola zcentrifugovaná 2 min pri 13 000 rpm. Koncentrácia vyizolovanej DNA bola stanovená pomocou fluorimetra. Vyizolovaná DNA bola dlhodobo uskladnená pri teplote -20°C.

Izolácia PCR produktov za použitia NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit bol použitý na izoláciu PCR produktov s vysokou koncentráciou. NTI pufor bol nariadený v pomere 1:5 s destilovanou vodou a k 20 µl PCR produktu bolo napipetovaných 80 µl destilovanej vody. Takto nariadený PCR produkt bol zmiešaný s 200 µl pripraveného NTI pufru. Celkový objem bol následne napipetovaný na povrch kolónky umiestnenej v zbernej skúmavke. Kolónka bola zcentrifugovaná pri 11 000 rpm po dobu 1 min, a filtrát bol odstránený. Na povrch kolónky bolo napipetovaných 600 µl NT3 pufru. Kolónka bola zcentrifugovaná pri 11 000 rpm po dobu 1 min a filtrát bol odstránený. Tento krok bol zopakovaný ešte raz. Kolónka bola zcentrifugovaná pri 11 000 rpm po dobu 2 min a premiestnená do novej 1,5ml mikroskúmavky. Na stred membrány kolónky bolo napipetovaných 25 µl destilovanej vody. Kolónka bola inkubovaná pri izbovej teplote po dobu 1 min a kolónka bola zcentrifugovaná pri 11 000 rpm po dobu 1 min. Koncentrácia vyizolovanej DNA bola stanovená pomocou fluorimetra, a vyizolovaná DNA bola dlhodobo uskladnená pri teplote - 20°C.

4.4.5 Sekvenačné značenie

Sekvenačné značenie bolo vykonané za použitia BigDye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kitu, pričom pre sekvenačnú reakciu bolo ako templát použité 25 ng DNA.

PCR reakčná zmes pozostávala z BigDye™ pufru, BigDye™ Ready Reaction Mix, primeru (forward alebo reverse), ktorý bol nariadený na 1,6 pmol·µl⁻¹, zloženie je uvedené v tabuľke 4. DNA bola sekvenovaná obojstranne za použitia tých istých primerov ako pri amplifikácii fragmentu. Reakčná zmes bola pripravená pre niekoľko vzoriek. Celý proces prípravy vzoriek

na PCR prebiehal na ľade v sterilnom laminárnom boxe. Pripravená reakčná zmes bola rozpipetovaná do 0,2ml mikroskúmaviek po 4 µl. Následne bolo pridaných 6 µl nariadenej templátovej DNA. Reakcia prebehla v termocyklére za podmienok uvedených v tabuľke 5.

Vlastné sekvenovanie pomocou genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 bolo prevedené v sekvenačnom centre Ústavu experimentální botaniky AV ĀR, Olomouc.

Tabuľka 4: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Položka	Pipetovaný objem [µl] na 1 test
BigDye™ pufor	1
BigDye™ Ready Reaction Mix	1
primer (forward alebo reverse)	2
celkom	4
Objem reakcie	10

Tabuľka 5: Podmienky PCR sekvenačného značenia

Fáza	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	95	60	1
denaturácia	95	10	40
nasadanie primerov	50	5	
elongácia	60	240	

4.4.6 Bioinformatická analýza

Výstupné dáta zo sekvenátora boli použité na zostavenie finálneho sekvenačného contigu za použitia programu MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Identita sekvencií bola následne potvrdená pomocou programu BLASTn (NCBI). Popri identifikácii sekvencií boli vyhľadané a stiahnuté odpovedajúce sekvencie COI *C. melanoneura* a mér *C. affinis*, *C. coccinea*, *C. burckhardti*, *C.*

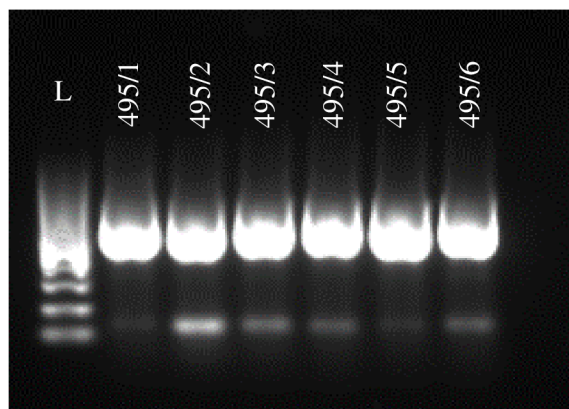
mali, *C. pruni*, *C. picta*, *C. pyri*, *C. pyricola* a *Trioza urticae*. Za použitia algoritmu ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) v programu MEGA 7.0 boli sekvencie zoradené do mnohopočetného alignmentu. Taktiež v tomto programe bola vyhodnotená variabilita analyzovaných nukleotidových sekvencií pomocou p-distance metódy a následne bola vyobrazená pomocou programu SDT 1.2 (Muhire *et al.*, 2014). Fylogenetická analýza bola prevedená v programe MEGA 7.0 na základe vytvoreného mnohopočetného alignmentu za použitia Neighbor-Joining algoritmu a Tamura 3-parametrického modelu pre nukleotidové sekvencie a JTT modelu pre aminokyselinové sekvencie, s bootstrap opakovaním 1000x. Fylogenetický strom bol vyobrazený a upravovaný za použitia programu TreeExplorer.

5 VÝSLEDKY

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bola analýza vybraného súboru jedincov *Cacopsylla melanoneura*, vektora fytoplazmy proliferácie jablone. Na potvrdenie identity jedincov a vyhodnotenie ich genetickej variability bola vybraná oblasť mitochondriálneho génu kódujúceho podjednotku I cytochróm c oxidázy.

5.1 Amplifikácia oblasti cytochróm c oxidázy podjednotky I

Na základe dostupnej literatúry boli vybraté a použité primery CPF4 a CPR4 (Kang *et al.*, 2012). Pre prácu bolo vybratých 32 vzoriek, z ktorých 16 vzoriek vyizolovanej DNA bolo z roku 2006 a 16 vzoriek DNA bolo vyizolovaných z jedincov novo odchytaných v roku 2022. Vzorky pochádzali z lokalít na južnej Morave (Lednice, Velké Němčice, Velké Bílovice). Pri 31 vzorkách bol úspešne získaný produkt o očakávanej veľkosti približne 700 bp. Príklad získaných špecifických produktov sú zobrazené na obrázku 3. V jednom prípade sa amplifikácia nevydarila a táto vzorka bola z ďalších analýz vyradená.



Obrázok 3: Produkty PCR amplifikácie oblasti cytochróm c oxidázy podjednotky I pomocou primerov CPF4 a CPR4 a MyTaq™ DNA polymerázy vyseparované v 1% agarózovom géle. (Legenda: L- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, jednotlivé vzorky označené číslami izolácie)

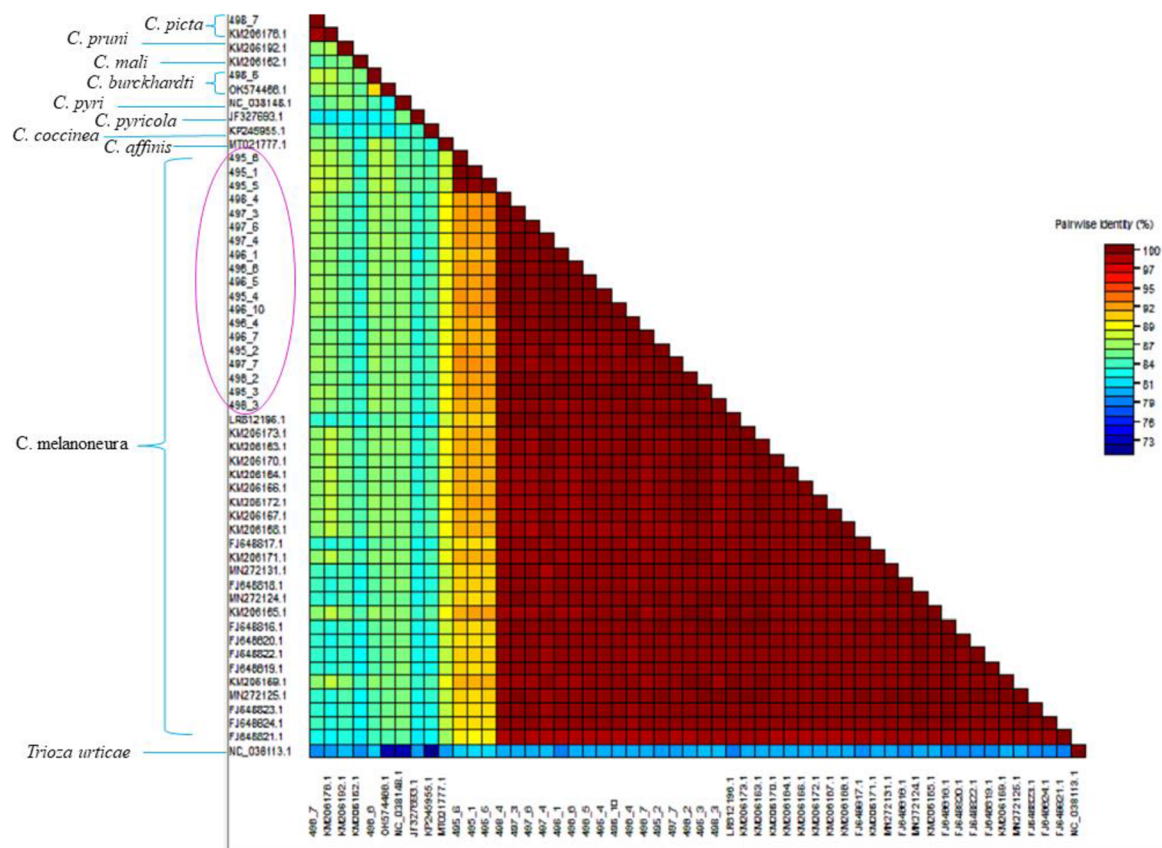
5.2 Analýza genetickej variability a fylogenetická analýza

Sangerovým sekvenovaním PCR amplikónov a následným skladaním sekvenačných výstupov bolo získaných 21 sekvencií o dĺžke 584-658 bp.

Špecifita produktov bola potvrdená pomocou algoritmu BLASTn (NCBI). Väčšina (18) získaných sekvencií vykazovala 99,2-100% identitu so sekvenciami génu COI zástupcov *Cacopsylla melanoneura* (Acc. No. KM206173.1, KM206163.1), dostupnými v databáze GenBank. Získané sekvencie 495/1, 5, 6 vykazovali 92% identitu so sekvenciou *Cacopsylla melanoneura* (KM206172.1). Sekvencia méry 498/6 vykazovala identitu 99,84% so sekvenciou *Cacopsylla picta* (KM206175.1) a sekvencia méry 498/7 vykazovala identitu 90,79% so sekvenciou *Cacopsylla burckhardti* (NC_069642.1).

Získané sekvencie boli následne porovnávané s vybraným súborom sekvencií pôvodom *C. melanoneura* a ďalších zástupcov r. *Cacopsylla*. Variabilita získaných parciálnych sekvencií COI bola vyhodnotená za použitia Muscle algoritmu programu SDT2.0, viď obrázok 4. Sekvencie väčšiny analyzovaných jedincov vykazujú 98-100% identitu so sekvenciami zástupcov *C. melanoneura* získanými z databáze GenBank. Analyzované vzorky patriace do série 495 s označením 495/1, 5, 6 z lokality Lednice a Velké Němčice boli od ostatných analyzovaných vzoriek mér rozdielne a vykazovali najvyššiu 89-92% identitu opäť s ostatnými českými sekvenciami *C. melanoneura* a so sekvenciami zástupcov *C. melanoneura* (KM206173.1, KM206163.1) získaných z databáze GenBank. Toto zistenie potvrdzuje výsledky získané pomocou algoritmu BLASTn. COI sekvencia z jedinca 498/6, vykazovala 99% identitu so sekvenciou *C. picta* (KM206173.1, KM206175.1). Avšak sekvencia jedinca 498/7 podľa metódy SDT vykazujú najvyššiu identitu (88%) s *Cacopsylla burckhardti*.

Analýza variabilných oblastí medzi sekvenciami ukázala veľkú podobnosť pomedzi jedincami 495/2, 3; 497/3, 6, 7; 498/2, 3, 4 a 495/4; 496/1, 4, 5, 6, 7, 10; 497/4, bola detekovaná jedna nukleotidová zámena, a to v pozícií 601, kde sekvencie vykazovali zámenu z C na T. Jedinci 495/1, 5, 6 vykazovali oveľa väčšiu variabilitu, bolo detekovaných 50 nukleotidových zámen. Kde v pozíciách 28, 117, 220, 357, 387, 435, 471, 517 a 576 dochádza k zámene z T na C alebo v pozíciách 63, 384, 579 dochádza k zámene z A na G. K zámene z G na A dochádza pri pozícií 93, 150, 291, 381, 411, 507, 588. Taktiež zámene z A na T bola pozorovaná v pozíciách 204, 564, 603, z T na A v 225, 267, 342, 348, 451, 558, 561, 591 a 609. V pozíciách ako je 264, 270, 273, 274, 297, 303, 309, 312, 366, 370, 375, 378, 399, 420, 555 a 612 bola zas pozorovaná zámene z C na T a v 369 a 597 zas z T na G. K zámene z A na C došlo len v pozícií 66 a k zámene C na G len v 360.

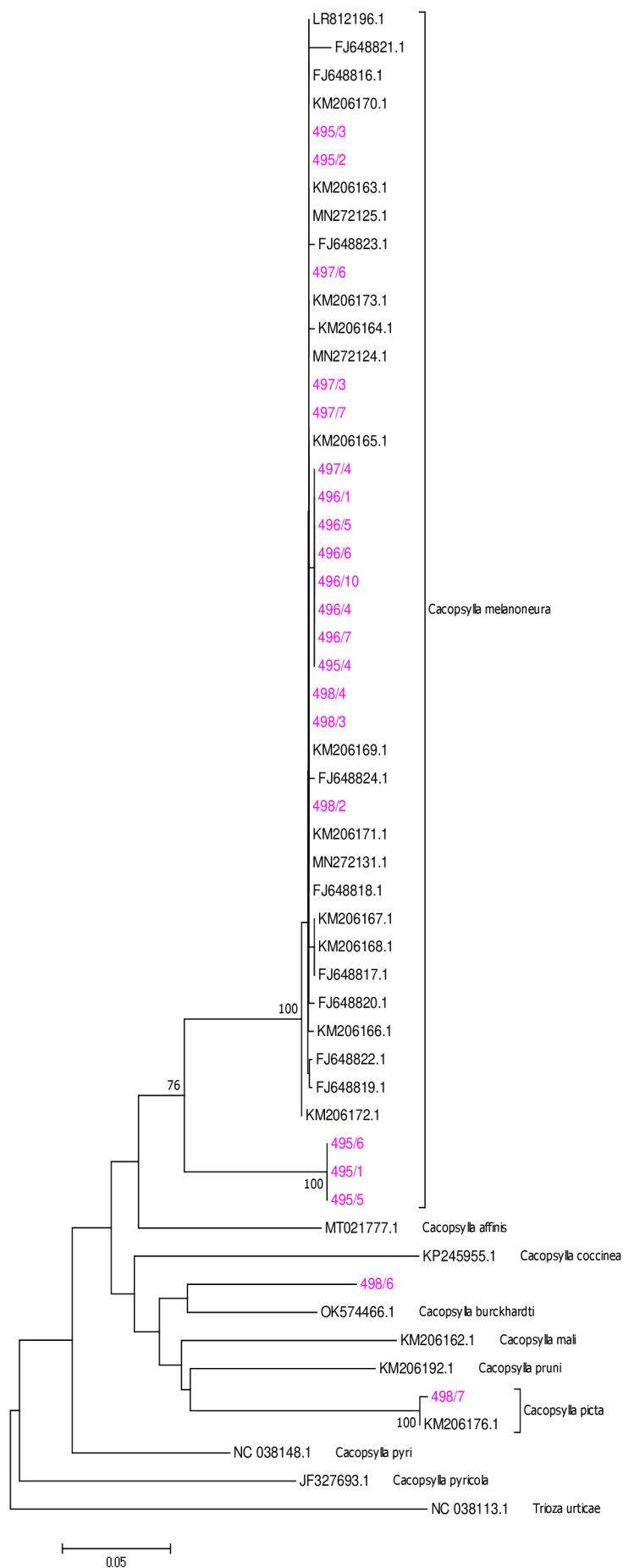


Obrázok 4: Analýza genetickej variability parciálnych sekvencií COI génu pri *C. melanoneura* a ďalších zástupcov rodu *Cacopsylla* pomocou algoritmu Muscle a programu SDT2.0. Farebná škála znázorňuje percentuálnu identitu a analyzovaní jedinci *C. melanoneura* sú označení číslom izolácie a zvýraznení fialovým ohraničením, sekvencie mér získané z databáze GenBank sú označené prislúchajúcim accesion number a druhom.

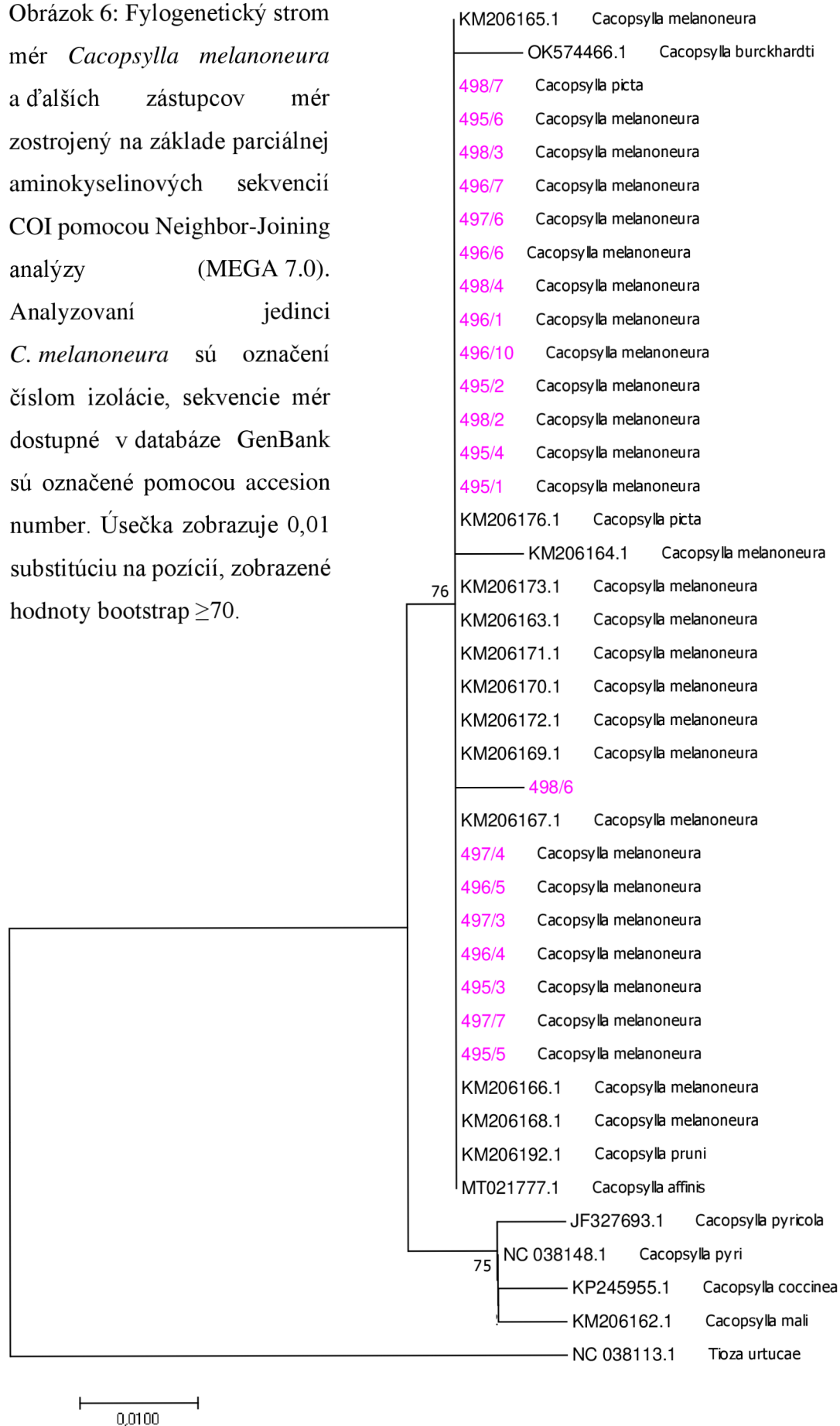
Fylogenetickou analýzou s použitím Neighbor-Joining algoritmu bola potvrdená zistená variabilita sekvencií, keďže sa českí jedinci identifikovaní na základe morfológických znakov ako *C. melanoneura* spoločne s ďalšími zástupcami *C. melanoneura* z Talianska vyvetvili do dvoch štatisticky preukazných evolučne blízkych vetiev (obrázok 5). V prvej štatisticky preukaznej skupine sa vytvorili dva nesignifikantné klastre. Do prvého klastru sa zaradili jedinci s označením 495/3, 495/2, 497/6, 497/3, 497/7, 498/4, 498/3, 498/2 a do druhého klastru spadali jedinci s označením 497/4, 496/1, 496/5, 496/6, 496/10, 496/4, 496/7, 495/4. Ďalší štatisticky preukazný klaster vytvorila získaná sekvencia tejto méry, gt08 (Acc. No. KM206172.1) pôvodom z Talianska. Sekvencie z jedincov 495/6, 495/1, 495/5 vytvorili druhú samostatnú vetvu. Tieto sekvencie majú vyššiu príbuznosť s analyzovanými sekvenciami mér *C. melanoneura* nachádzajúcich sa v prvej vetve ako s inými zástupcami rodu *Cacopsylla*. Dvaja jedinci 498/6 a 498/7, ktorých identita nebola známa sa vyvetvili do odlišných vetiev. Kde jedinec 498/7 sa vyvetvil so sekvenciou *C. picta* (KM206176.1.), teda sa určite jedná o *C. pictu* a jedinec 498/6 sa vyvetvil v blízkosti *Cacopsylla burckhardti* (OK574466.1).

Fylogenetická analýza ďalej ukázala, že na základe aminokyselinových sekvencií sa do samostatnej vetve vyvetvili *C. pyri*, *C. pyricola*, *C. mali*, *C. coccinea*, ale zástupcov *C. pruni*, *C. affinis*, *C. melanoneura*, *C. picta* a *C. burckhardti* nebolo možné odlíšiť, keďže sa vyvetvili do druhej rozsiahlej vetvy (obrázok 6).

Obrázok 5: Fylogenetický strom jedincov mér *Cacopsylla melanoneura* a ďalších zástupcov mér zostrojený na základe Neighbor-Joining analýzy parciálnych sekvencií COI génu (MEGA 7.0). Analyzované sekvencie *C. melanoneura* sú vyznačené číslom izolácie a fialovou farbou, sekvencie mér dostupné v databáze GenBank sú označené pomocou accession number. Úsečka zobrazuje 0,05 substitúciu na pozícií, zobrazené hodnoty bootstrap ≥ 70 .



Obrázok 6: Fylogenetický strom mér *Cacopsylla melanoneura* a ďalších zástupcov mér zostrojený na základe parciálnej aminokyselinových sekvencií COI pomocou Neighbor-Joining analýzy (MEGA 7.0). Analyzovaní jedinci *C. melanoneura* sú označení číslom izolácie, sekvencie mér dostupné v databáze GenBank sú označené pomocou accesion number. Úsečka zobrazuje 0,01 substitúciu na pozícií, zobrazené hodnoty bootstrap ≥ 70 .



6 DISKUSIA

Méry zahŕňajú početnú skupinu patriacu k hmyzu sajúceho rastlinné šťavy. V Európe méry patriace do rodu *Cacopsylla* sa zaraďujú medzi hlavných hmyzích škodcov schopných prenášať fytoplazmy, obligátne vnútrobunkové baktérie, ktoré kolonizujú floém mnohých druhov rastlín a spôsobujú stovky chorôb rastlín na celom svete. Jedným z takých vektorov je aj *Cacopsylla melanoneura*, ktorá je viacej alebo menej efektívne schopným prenášačom fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*', spôsobujúcu proliferáciu jabloní. Keďže nie je možná priama liečba takýchto ochorení, tak je monitorovanie a kontrola ich vektorov veľmi dôležité (Schuler *et al.*, 2022; Tadeschi *et al.*, 2006).

Experimentálna časť bakalárskej práce bola zameraná na analýzu vybraného súboru jedincov *Cacopsylla melanoneura*, vektora fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*', ich bioinformatickú analýzu, zistenie genetickej variability populácií z južnej Moravy. Pričom neboli zistené signifikantné rozdiely medzi rokmi 2006 a 2022. Avšak všetci traja jedinci, ktorí sa vyvetvili do samostatnej vetvy pochádzali len z roku 2006. Taktiež bolo zistené, že sa analyzované sekvencie mér *Cacopsylla melanoneura* pochádzajúce z Českej republiky výrazne neodlišovali od sekvencií mér pochádzajúcich z Talianska.

Získané sekvencie jedincov mér *C. melanoneura* sa za pomoci fylogenetickej analýzy oblasti cytochróm c oxidázy podjednotky I vyvetvili do dvoch hlavných vetiev, pričom v prvej skupine je viditeľná variabilita génu pre COI, keďže sa v tejto skupine vytvorili tri klastre. Podobnú situáciu popísali aj Oettl *et Schlink* (2015). Avšak takmer všetky sekvencie pochádzajúce z Českej republiky a, ktoré boli analyzované, sa vyvetvili do jednej spoločnej vetvy.

Bolo zistené, že variabilita génu pre COI je pravdepodobne väčšia, keďže dve sekvencie 495/1, 6 pochádzajúce z jedincov pôvodom z lokality Lednice a jedna sekvencia z jedinca z Velkých Němčíc získané z 29.5.2006 sa výrazne odlišovali od ostatných a vyvetvili sa do samostatnej vetvy. Tieto sekvencie avšak vykazovali určitú podobnosť s ostatnými sekvenciami zástupcov *C. melanoneura* a nevykazovali vyššiu podobnosť so známymi sekvenciami COI génu zo žiadneho iného druhu rodu *Cacopsylla*. Avšak stále je otázkou, či sa jednoznačne jedná o druh *C. melanoneura*. Na presné overenie by bola potrebná ďalšia analýza na viacerých génoch. Ďalšou alternatívou môže byť, že sa v rámci druhu *C. melanoneura* v Európe vyskytujú dva rôzne poddruhy, čo by mohlo mať súvislosť s prenosovými schopnosťami, keďže v Taliansku je považovaná za hlavného vektora prenášajúceho fytoplazmu '*Candidatus Phytoplasma mali*' zatiaľ čo v Nemecku nie je. Aj keď sa nedá vylúčiť,

že rozhodujúce pre schopnosť alebo neschopnosť *C. melanoneura* infikovať sa a prenášať fytoplazmu je daná prítomnosťou endosymbiotických baktérií, najmä rodu *Carsonella* a *Wolbachia* (Schuler et al., 2022). Taktiež by sa mohlo jednať o kryptický druh ako v prípade *Cacopsylla pruni*, kde táto méra zahŕňa dve veľmi odlišné genetické skupiny označované ako skupina A a B (Peccoud et al., 2013).

Méry je aj pre profesionálnych entomológov veľmi náročné od seba odlíšiť na základe morfológických znakov, pričom je hlavne problematické identifikovanie samíc. Z toho dôvodu môžu byť jedinci chybné identifikovaní a následne môže dôjsť k nesprávnemu priradeniu do správneho druhu rodu *Cacopsylla*. Daný fakt sa potvrdil aj pri dvoch analyzovaných jedincoch. Samica 498/6 pochádzajúca z Ledníc vykazovala 99,84% identitu so sekvenciou *Cacopsylla picta* a samica 498/7 z Ledníc vykazovala identitu 90,79% so sekvenciou *Cacopsylla burckhardti*. Pomocou fylogenetickú analýzu sa jedinec 498/6 vyvetvil do skupiny so sekvenciou zástupcov *Cacopsylla picta*. Vzhľadom k týmto výsledkom je jasné, že bolo druhové zaradenie nejasné a nejedná sa o samicu méry *Cacopsylla melanoneura* ale o méru *Cacopsylla picta*. Avšak čo sa týka jedinca 498/7, tak sa nedá s ohľadom na dĺžku vetvy s určitosťou povedať, či sa skutočne jedná o jedinca druhu *Cacopsylla burckhardti*. Na presné určenie by bola potrebná ďalšia analýza založená na porovnávaní s inými sekvenciami alebo získať sekvencie z ďalších oblastí mitochondriálnej DNA. Skutočnosť, že naozaj dochádza k chybnému identifikovaniu mér a že molekulárna metóda založená na analýze cytochrom c oxidázy podjednotky I je vhodná na identifikáciu neznámych, či sporných jedincov bolo v posledných rokoch opakovane preukázané. Dosvedčuje tomu aj fakt, že napríklad na základe morfológickej identifikácie došlo k nesprávnemu určeniu mér rodu *Cacopsylla*, kde bol jeden jedinec (samica) identifikovaný ako *Cacopsylla pyri* a ďalší jedinec (samica) ako *Cacopsylla brevipennata*. Ale za použitia metódy PCR-RFLP, pri ktorej bola na molekulárnu identifikáciu použitá oblasť cytochrom c oxidázy podjednotky I bolo možné ich reklasifikovať a zaradiť do správneho druhu, keďže jedinec identifikovaný ako *Cacopsylla pyri* vykazoval 98,6% identitu so sekvenciou *Cacopsylla melanoneura* a jedinec identifikovaný ako *Cacopsylla brevipennata* vykazoval 99,7% identitu s *Cacopsylla pyri* (Oettl et Schlink, 2015). Využitie sekvencií prístupných v databáze Genbank a ich nesprávna morfológická determinácia je hlavným problémom, keďže sú využívané v molekulárnych štúdiách. Analýza COI oblasti umožnila identifikáciu a reklasifikáciu rady sekvencií z GenBank priradených k nesprávnym druhom. Napríklad, že kórejské sekvencie *Cacopsylla pyricola* dostupné v GenBank sa výrazne

líšia od európskych jedincov *Cacopsylla pyricola*, ale nevykazujú žiadnu významnú odlišnosť od *Cacopsylla jukyungi*, preto sa jednalo o jedincov tohto druhu méry (Cho *et al.*, 2020).

7 ZÁVER

Méry patria k drobnému hmyzu a niektoré z nich sú považované za významných poľnohospodárskych škodcov. Závažným problémom ich výskytu v sadoch je skutočnosť, že sú vektormi fytopatogénnych organizmov, fytoplaziem, ktoré sú schopné sať na infikovaných rastlinách a šíriť ich na zdravé rastliny. Príkladom takéhoto prenášača je aj méra *C. melanoneura*, ktorá je v niektorých krajinách považovaná za významného prenášača fytoplazmy '*Candidatus Phytoplasma mali*', ktorá vyvoláva ochorenie proliferácie jabloní. Identifikácia mér na základe morfologických vlastností je veľmi náročná, pri samičkách niekedy takmer nemožná, a z toho dôvodu sa v súčasnej dobe začínajú na identifikáciu jedincov používať molekulárne metódy založené predovšetkým na analýze génu pre cytochróm c oxidázu, podjednotky I (COI). Tieto metódy celý proces identifikácie uľahčujú a pomáhajú identifikovať neznáme či sporné jedince.

Experimentálna časť bakalárskej práce sa zaoberala analýzou vybraného súboru jedincov *C. melanoneura*. Boli analyzovaní jedinci týchto mér pochádzajúcich z 3 lokalít na južnej Morave, a to Lednice, Velké Němčice a Velké Bílovice, odchytených v rokoch 2006 a 2022.

Sangerovým sekvenovaním boli získané parciálne sekvencie COI génu o dĺžke 584-658 bp pri 21 jedincoch. Za použitia algoritmu BLASTn bolo zistené, že väčšina sekvencií vykazovala nízku variabilitu a najvyššiu, 99,2-100%, identitu so sekvenciami génu COI zástupcov *C. melanoneura* dostupnými v GenBank. Traja jedinci vykazovali iba 92% identitu, táto skutočnosť bola potvrdená aj pomocou SDT2.0 analýzy. U dvoch jedincov bolo zistené, že nenáležia k druhu *C. melanoneura*, jedna méra 498/6 vykazovala najväčšiu identitu (99,84%) so sekvenciou *C. picta* a méra 498/7 (90,79%) so sekvenciou *Cacopsylla burckhardti*.

Fylogenetická analýza potvrdila toto zistenie, keďže väčšina analyzovaných českých jedincov sa vyvetvila do jednej vetvy spoločne s ďalšími jedincami *C. melanoneura* a traja jedinci vytvorili druhú samostatnú vetvu, pričom títo jedinci vykazovali príbuznosť s ostatnými sekvenciami *C. melanoneura*. Topológia stromu potvrdila identitu jedinca 498/6, ktorý sa vyvetvil spoločne so zástupcom *C. picta* a príbuznosť jedinca 498/7 k *C. burckhardti*.

Na základe výsledkov je možné usúdiť, že molekulárna metóda založená na analýze COI je vhodnou metódou na molekulárnu identifikáciu a overenie taxonomického zaradenia jedincov mér rodu *Cacopsylla*.

8 LITERATÚRA

- Ablett E. M. (1994): An appraisal of RAPD-PCR: a new molecular tool for the identification of invertebrate species. *Memoirs of the Queensland Museum* 36 (1): 1–2.
- Al-Ghaithi A. G., Al-Sadi A. M., Al-Hammadi M. S., Al-Shariqi R. M., Al-Yahyai R. A., Al-Mahmooli I. H., Carvalho C. M., Elliot S. L., Hogenhout S. A. (2017): Expression of phytoplasma-induced witches' broom disease symptoms in acid lime (*Citrus aurantifolia*) trees is affected by climatic conditions. *The Plant Pathology Journal* 66: 1380–1388.
- Alivizatos A. S., Markham P. G. (1986): Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Annals of Applied Biology* 108 (3): 535–544.
- Aly S. M. (2014): Reliability of long vs short COI markers in identification of forensically important flies. *Croatian Medical Journal* 55 (1): 19–26.
- Annecke D. P., Cilliers C. J. (1963): The citrus psylla, *Trioza erythrae* (Del Guercio), and its parasites. *South African Journal of Agricultural Science* 6 (2): 187–192.
- Antil S., Abraham J.S., Sripoorna S., Maurya S., Dagar J., Makhija S., Bhagat P., Gupta R., Sood U., Lal R., Toteja R. (2023): DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review. *Molecular Biology Reports* 50: 761–775.
- Arismendi N. L., Carrillo R. (2015): Survival, fecundity, and body mass of *Amplipcephalus curtulus* influenced by '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' (16SrV-A) infection. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155: 176–183.
- Atwal A. S., Chaudhary J. P., Ramzan M. (1970): Studies on the development and field population of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Psyllidae: Homoptera). *Journal of Research-Punjab Agricultural University* 7: 333–338.
- Avosani S., Mankin R. W., Sullivan T. E. S., Polajnar J., Suckling D. M., Mazzoni V. (2022): Vibrational communication in psyllids. In: Hill P.S.M., Mazzoni V., Stritih-Peljhan N., Virant-Doberlet M., Wessel A. (eds): *Biotremology: Physiology, Ecology, and Evolution*, pp. 529–546, Cham: Springer International Publishing.
- Beanland L., Hoy C. W., Miller S. A., Nault L. R. (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93 (2): 271–276.
- Behura S. K. (2006): Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15 (11): 3087–3113.

- Bertaccini A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673–689.
- Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., Contaldo N. (2014): Phytoplasmas and phytoplasma Diseases: A severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5 (12): 1763–1788.
- Blattný C., Seidl V., Erbenová M. (1963): The Apple proliferation of various sorts and the possible strain differentiation of the virus. *Phytopathologia Mediterranea* 2 (3): 119–123.
- Bosco D., Marzachi C. (2016): Insect transmission of phytoplasmas. In: Brown J.K. (ed.): *Vector-mediated transmission of plant pathogens*, pp. 319–327, The American Phytopathological Society.
- Bosco D., Tedeschi R. (2013): Insect vector transmission assays. In: Dickinson M., Hodgetts J. (eds): *Phytoplasma*, pp. 73–85, Humana Press, Totowa, NJ.
- Boucher D. H., James S., Keeler K. H. (1982): The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13 (1): 315–347.
- Bovey R. (1963): Observations and experiments on Apple proliferation disease. *Phytopathologia Mediterranea* 2 (3): 111–114.
- Boykin L. M., Bagnall R. A., Frohlich D. R., Hall D. G., Hunter W. B., Katsar C. S., McKenzie C. L., Rosell R. C., Shatters R. G. (2007): Twelve polymorphic microsatellite loci from the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, the vector for citrus greening disease, huanglongbing. *Molecular Ecology Notes* 7 (6): 1202–1204.
- Bressan A., Turata R., Maixner M., Spiazzi S., Boudon-Padieu E., Girolami V. (2007): Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology* 150 (3): 331–339.
- Bronstein J. L. (1994): Our current understanding of mutualism. *The Quarterly Review of Biology* 69: 31–51.
- Burckhardt D. (1994): Psylloid pests of temperate and subtropical crop and ornamental plants (Hemiptera, Psylloidea): A review. *Trends in Agricultural Sciences, Entomology* 2: 173–186.
- Burrows M. (2012): Jumping mechanisms in jumping plant lice (Hemiptera, Sternorrhyncha, Psyllidae). *Journal of Experimental Biology* 215: 3612–3621.
- Carginale V., Maria G., Capasso C., Ionata E., La Cara F., Pastore M., Bertaccini A., Capasso A. (2004): Identification of genes expressed in response to phytoplasma infection in leaves of *Prunus armeniaca* by messenger RNA differential display. *Gene* 332: 29–34.

- Carraro L., Loi N., Ermacora P. (2001): Transmission characteristics of the European stonefruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 695–700.
- Conci C. (1998): The earliest literature on Psylloidea (Insecta Homoptera). *Atti dell'Accademia Roveretana degli Agiati*, a.248, ser. VII, vol. VIII (B): 41–66.
- Čermák V., Lauterer P. (2008): Overwintering of psyllids in South Moravia (Czech Republic) with respect to the vectors of the apple proliferation cluster phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 61 (1):147–148.
- Delabie J. H. C. (2001): Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an overview. *Neotropical Entomology* 30 (4): 501–516.
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.-M. (2007): The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81–106.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H. (1967): Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Japanese Journal of Phytopathology* 33 (4): 259–266.
- Douglas A. E. (2006): Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *Journal of Experimental Botany* 57 (4): 747–754.
- Eben A., Gross J. (2013): Innovative control of psyllid vectors of European fruit tree phytoplasmas. *Phytopathogenic Mollicutes* 3 (1): 37–39.
- Elbrecht V., Taberlet P., Dejean T., Valentini A., Usseglio-Polatera P., Beisel J.-N., Coissac E., Boyer F., Leese F. (2016): Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ* 4.
- Eyer J. R. (1937): Physiology of psyllid yellows of potatoes. *Journal of Economic Entomology* 30 (6): 891–898.
- Fisher T. W., Vyas M., He R., Nelson W., Cicero J. M., Willer M., Kim R., Kramer R., May G. A., Crow J. A., Soderlund C. A., Gang D. R., Brown J. K. (2014): Comparison of potato and asian citrus psyllid adult and nymph transcriptomes identified vector transcripts with potential involvement in circulative, propagative liberibacter transmission. *Pathogens* 3 (4): 875–907.
- Fletcher J., Wayadande A., Melcher U., Ye F. (1998): The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: A closer look. *Phytopathology* 88 (12): 1351–1358.

- Gallinger J., Gross J. (2018): Unraveling the host plant alternation of *Cacopsylla pruni* – adults but not nymphs can survive on conifers due to phloem/xylem composition. *Frontiers in Plant Science* 9 (484): 1–12.
- Garcia-Salazar C., Whalon M. E., Rahardja U. (1991): Temperature-dependent pathogenicity of the X-disease mycoplasma-like organism to its vector, *Paraphlepsius irroratus* (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology* 20 (1): 179–184.
- Golino D. A., Oldfield G. N., Gumpf D. J. (1987): Transmission characteristics of the beet leafhopper transmitted virescence agent. *Phytopathology* 77: 954–957.
- Greber R. S., Gowanlock D. H. (1979): Rickettsia-like and mycoplasma-like organisms associated with two yellow-type diseases of strawberries in Queensland. *Crop & Pasture Science* 30: 1101–1109.
- Gullan P. J., Martin J. H. (2009): Sternorrhyncha: (Jumping plant-lice, whiteflies, aphids, and scale insects). In: Resh V. H., Cardé R. T. (eds): *Encyclopedia of Insects* (Second Edition), pp. 957–967, Academic Press, Amsterdam.
- Guo Y. D., Cai J. F., Li X., Xiong F., Su R. N., Chen F. L., Liu Q. L., Wang X. H., Chang Y. F., Zhong M., Wang X., Wen J. F. (2010): Identification of the forensically important sarcophagid flies *Boerttcherisca peregrina*, *Parasarcophaga albiceps* and *Parasarcophaga dux* (Diptera: Sarcophagidae) based on COII gene in China. *Tropical Biomedicine* 27: 451–460.
- Hackman R. H., Trikojus V. M. (1952): The composition of the honeydew excreted by Australian coccids of the genus *Ceroplastes*. *Biochemical Journal* 51 (5): 653–656.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B. (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1 (1): 55–63.
- Haymer D. S. (1994): Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Annals of the Entomological Society of America* 87 (6): 717–722.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., Dewaard J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270 (1512): 313–321.
- Hill A. R. (2009): The biology of *Anthocoris nemorum* (L.) in Scotland (Hemiptera: Anthocoridae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 109 (13): 379–394.

- Hodkinson I. D. (1973): The biology of *Strophingia ericae* (Curtis) (Homoptera: Psylloidea) with notes on its primary parasite *Tetrastichus actis* (Walker) (Hym., Eulophidae). Norwegian Journal of Entomology 20: 237–243.
- Hodkinson I. D. (1974): The biology of the Psylloidea (Homoptera): A review. Bulletin of Entomological Research 64 (2): 325–338.
- Hodkinson I. D. (1984): The biology and ecology of the gall-forming Psylloidea (Homoptera). In: Ananthakrishnan T. N. (Ed.): Biology of gall insects, pp. 59–77, Hodder Arnold H&S, New Delhi, India.
- Hodkinson I. D. (2009): Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera:Psylloidea): a global synthesis. Journal of Natural History 43 (1): 65–179.
- Hodkinson I. D. (2015): Psyllidae (Jumping plant-lice, psyllids). In: Böcher J., Kristensen N.P., Pape T., Vilhelmsen L. (eds): The Greenland entomofauna: an identification manual of insects, spiders and their allies, pp. 113-119, BRILL, Boston.
- Hodkinson I. D., Bird J. M. (2006): Facultative parthenogenesis in *Cacopsylla myrtilli* (Wagner) (Hemiptera: Psylloidea) in northern Sweden. Entomol Tidskrift 127: 157–160.
- Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar E.-D., Kakizawa S., Kingdom H. N., Namba S. (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology 9 (4): 403–423.
- Cho G., Malenovský I., Burckhardt D., Inoue H., Lee S. (2020): DNA barcoding of pear psyllids (Hemiptera: Psylloidea: Psyllidae), a tale of continued misidentifications. Bulletin of Entomological Research 110 (4): 521–534.
- Imtiaz A., Nor S. A. M., Naim D. M. (2017): Progress and potential of DNA barcoding for species identification of fish species. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 18 (4): 1394–1405.
- Jalali S. K., Ojha R., Venkatesan T. (2015): DNA Barcoding for identification of agriculturally important insects. In: Chakravarthy A. K. (ed.): New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management, pp. 13–23, Springer India, New Delhi.
- Janik K., Barthel D., Oppedisano T., Anfora G., Angeli G., Baldessari M., Bianchedi P. L., Campisano A., Covelli L., Dallago G., Fischnaller S., Ioriatti C., Jarausch W., Letschka T., Mazzoni V., Mittelberger C., Moser M., Öttl S., Panassiti B., Pedrazzoli F., Rota-Stabelli O., Schuler H., Schweigkofler W., Tedeschi R., Weil T. (2020): Apple proliferation - a joint review. Fondazione Edmund Mach, San Michele all' Adige (TN) - Laimburg Research Centre, Laimburg Ora (BZ).

- Jensen D. D. (1957): Parasites of the Psyllidae. *Hilgardia* 27 (2): 71–99.
- Jerinic-Prodanovic D., Protić L. (2013): True bugs (Hemiptera, Heteroptera) as psyllid predators (Hemiptera, Psylloidea). *ZooKeys* 319: 169–189.
- Kang A. R., Baek J. Y., Lee S. H., Cho Y. S., Kim W. S., Han Y. S., Kim I. (2012): Geographic homogeneity and high gene flow of the pear psylla, *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera: Psyllidae), detected by mitochondrial COI gene and nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2. *Animal Cells and Systems* 16 (2): 145–153.
- Kartte S., Seemüller E. (1988): Variable response within the genus *Malus* to the apple proliferation disease / Unterschiedliche Reaktion auf die Apfeltriebsucht innerhalb der Gattung *Malus*. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection* 95 (1): 25–34.
- Kocourek F., Bagar M., Falta V., Harašta P., Holý K., Chroboková E., Kloutvorová J., Kůdela V., Lánský M., Náměstek J., Navrátil M., Ouředníčková J., Pluhař P., Psota V., Pultar O., Stará J., Suchá J., Sus J., Šafařová D., Špak J., Valentová L. (2015): *Integrovaná ochrana ovocných plodin*. Profi Press, Praha.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology Evolution* 33 (7):1870–1874.
- Larsen K. J., Heady S. E., Nault L. R. (1992): Influence of ants (Hymenoptera: Formicidae) on honeydew excretion and escape behaviors in a myrmecophile, *dalbulus quinquenotatus* (Homoptera: Cicadellidae), and its congeners. *Journal of Insect Behavior* 5 (1): 109–122.
- Lauterer P. (1993): Psyllids (Homoptera, Psylloidea) from the area flooded by the Nové Mlýny reservoir system and its environs in southern Moravia. *Acta Musei Moraviae, Scientiae Naturales* 78: 165–200.
- Lauterer P. (1999): Results of the investigations on Hemiptera in Moravia, made by the Moravian museum (Psylloidea 2). *Acta Musei Moraviae, Scientiae Biologicae* 84: 71–151.
- Lauterer P. (2001): Mery (Sternorrhyncha, Psylloidea) Jizerských hor. (The jumping plant-lice (Sternorrhyncha, Psylloidea) of the Jizerske hory Mountains.) *Sborník Severočeského Muzea, Přírodní Vědy* 22: 85–99.
- Lauterer P., Malenovský I. (2005): Psylloidea (mery). In: Farkač J., Král D., Škorpík M. (eds.): *Červený seznam ohrožených druhů České republiky*. Bezobratlí, pp. 156–159, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.

- Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Bertaccini A. (1998): Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology* 88 (12): 1359–1366.
- Lee I. M., Davis R. E., Gundersen-Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54 (1): 221–255.
- Lessinger A. C., Martins Junqueira A. C., Lemos T. A., Kemper E. L., Da Silva F. R., Vettore A. L., Arruda P., Azeredo-Espin A. M. L. (2000): The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect Molecular Biology* 9 (5): 521–529.
- Lherminier J., Prensier G., Boudon-Padiou E., Caudwell A. (1990): Immunolabeling of grapevine flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 38 (1): 79–85.
- Loxdale H. D., Lushai G. (1998): Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88 (6): 577–600.
- Lubanga U., Guédot Ch., Percy D., Steinbauer M. (2014): Semiochemical and vibrational cues and signals mediating mate finding and courtship in Psylloidea (Hemiptera): A Synthesis. *Insects* 5 (3): 577–595.
- Madden L. V., Nault L. R. (1983): Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Balbulus* species. *Phytopathology* 73 (12): 1608–1614.
- Madden L. V., Nault L. R., Heady S. E., Styer W. E. (1984): Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* leafhopper vectors. *Annals of Applied Biology*, 105 (3): 431–441.
- Malagnini V., Pedrazzoli F., Gualandri V., Forno F., Zasso R., Pozzebon A., Ioriatti C. (2010): A study of the effects of '*Candidatus* Phytoplasma mali' on the psyllid *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (1): 65–67.
- Malenovský I. (2006): Mery (Psylloidea, Hemiptera) CHKO Kokořínsko. (Jumping plant-lice (Psylloidea, Hemiptera) of Kokořínsko Protected Landscape Area.) *Bohemia Centralis* 27: 323–332.
- Malenovsky I., Lauterer P. (2012): Jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) of the Bílé Karpaty Protected Landscape Area and Biosphere Reserve (Czech Republic). *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* 96: 105–154.
- Martin NA. 2010, revised 2018. *Pittosporum* psyllid-*Trioza vitreoradiata*. Interesting Insects and other Invertebrates. New Zealand Arthropod Factsheet Series Number 9.

- Mayer C. J., Jarausch B., Jarausch W., Jelkmann W., Vilcinskis A., Gross J. (2009): *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. *Phytopathology* 99 (6): 729–738.
- Meudt H. M., Clarke A. C. (2007): Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12 (3): 106–117.
- Moore K. M. (1970): Observations on some Australian forest insects 24. Results from a study of the genus *Glycaspis* (Homoptera: Psyllidae). *The Australian zoologist* 15: 343–376.
- Moreno A., Miranda M. P., Fereres A. (2021): Psyllids as major vectors of plant pathogens. *Entomologia Generalis* 41 (5): 419–438.
- Muhire B. M., Varsani A., Martin D. P. (2014): SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE* 9(9): e108277.
- Murrall D. J., Nault L. R., Hoy C. W., Madden L. V., Miller S. A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 89 (5): 1223–1232.
- Musetti R., Favali M.A., Pressacco L. (2000): Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios-Cambridge* 102 (401): 133–148.
- Musetti R., Sanità di Toppi L., Ermacora P., Favali M. A. (2004): Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94 (2): 203–208.
- Nault L. R. (1997): Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90 (5): 521–541.
- Oetli S., Schlink K. (2015): Molecular identification of two vector species, *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla picta* (Hemiptera: Psyllidae), of apple proliferation disease and further common psyllids of Northern Italy. *Journal of Economic Entomology* 108 (5): 2174–2183.
- Ossiannilsson F. (1992): The Psylloidea (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. In: Kristensen N. P., Michelsen V. (eds.): *Fauna Entomologica Scandinavica*, pp. 26–347, Leiden (NL), New York (USA), Cologne (D): BRILL.
- Ossiannilsson F. (1950): Sound production in psyllids (Hem. Hom.). *Opuscula Entomologica* 15: 202.
- Ouvrard D., Burckhardt D., Cocquempot Ch. (2015a): An annotated checklist of the jumping plant-lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea) from the Mercantour National Park, with seven new records for France and one new synonymy. *Zoosystema* 37 (1): 251–271.

- Ouvrard D., Chalise P., Percy D. M. (2015b): Host-plant leaps versus host-plant shuffle: a global survey reveals contrasting patterns in an oligophagous insect group (Hemiptera: Psylloidea). *Systematics and Biodiversity* 13: 434–454.
- Pande Y. D. (1972): Seasonal fluctuations in the abundance and host preference of *Diaphorinacitri* Kuw. in relation to certain species of citrus. *The Indian Journal of Agricultural Research* 6: 51–54.
- Paun O., Schönswetter P. (2012): Amplified Fragment Length Polymorphism: An invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. In: Sucher, N. J., Hennell J. R., Carles M. C. (ed.): *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding*, pp. 75–87, Humana Press, Totowa, NJ.
- Peccoud J., Labonne G., Sauvion N. (2013): Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex. *PLoS ONE* 8 (8): e72454.
- Porter T. M., Gibson J. F., Shokralla S., Baird D. J., Golding G. B., Hajibabaei M. (2014): Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier. *Molecular Ecology Resources* 14 (5): 929–42.
- Queiroz R. B., Donkersley P., Silva F. N., Al-Mahmmoli I. H., Al-Sadi A. M., Carvalho C. M., Elliot S. L. (2016): Invasive mutualisms between a plant pathogen and insect vectors in the Middle East and Brazil. *Royal Society Open Science* 3 (12): 160557.
- Rasmussen H. B. (2012): Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR - amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In: Magdeldin S. (ed.): *Gel electrophoresis – principles and basics*, pp. 315–334. InTech.
- Richards A. G., Brooks M. A. (1958): Internal symbiosis in insects. *Annual Review of Entomology* 3 (1): 37–56.
- Robinson D. M. (1961a): The parasites of the Psyllidae-2. *Parapsyllae-Phagus Adulticolus* gen. et sp. nov., the first Hymenopterous parasite of an adult psyllid (Homoptera). *Annals and Magazine of Natural History* 4 (38): 117–121.
- Robinson D. M. (1961b): The parasites of the Psyllidae-3. Some notes on the biology and host relationships of *Parapsyllae-Phagus Adulticolus* Robinson (Hymenoptera). *Annals and Magazine of Natural History* 4 (39): 155–159.
- Robinson D. M. (1961c): *Parapsyllae-phagus adulticolus* Robinson, an invalid synonym of *Sectiliclava cleone* (Walker) (Insecta: Hymenoptera). *Annals and Magazine of Natural History* 4 (48): 755.

- Roderick G. K. (1996): Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology* 41 (1): 325–352.
- Rolo E. A., Oliveira A. R., Dourado C. G., Farinha A., Rebelo M. T., Dias D. (2013): Identification of sarcosaprophagous *Diptera* species through DNA barcoding in wildlife forensics. *Forensic Science International* 228 (1–3): 160–164.
- Rondon S., Oppedisano T. (2020): Biology and management of the beet leafhopper and purple top phytoplasma affecting potatoes in the Pacific Northwest. Oregon State University Extension Service.
- Rudzińska-Langwald A., Kamińska M. (1999): Cytopathological evidence for transport of phytoplasma in infected plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 68 (4): 261–266.
- Sharma A., Khan A. N., Subrahmanyam S., Raman A., Taylor G. S., Fletcher M. J. (2014): Salivary proteins of plant-feeding hemipteroids-implication in phytophagy. *Bulletin of Entomological Research* 104: 117–136.
- Sharma A., Madhavan S., Raman A., Taylor G., Fletcher M. (2015): Salivary gland structure of *Ctenarytaina eucalypti* (Hemiptera: Aphalaridae) and interaction of salivary proteins with *Eucalyptus globulus*. *Polish Journal of Entomology* 84: 21–32.
- Sharma A., Raman A. (2017): LARSE (Insecta: Hemiptera). *Current Science* 113 (8): 1543–1552.
- Shoujie Ch., Ling Z., Yijuan X. (2015): Mutualism between fire ants and mealybugs reduces lady beetle predation. *Journal of Economic Entomology* 108 (4): 1560–1569.
- Schmid G. (1975). Prolonged observations on spread and behaviour of proliferation disease in apple orchards. *Acta Horticulturae* 44: 183–192.
- Schuler H., Dittmer J., Borruso L., Galli J., Fischnaller S., Anfora G., Rota-Stabelli O., Weil T., Janik K. (2022): Investigating the microbial community of *Cacopsylla* spp. as potential factor in vector competence of phytoplasma. *Environmental Microbiology* 24 (10): 4771–4786.
- Simon S., Schierwater B., Hadrys H. (2010): On the value of Elongation factor-1 α for reconstructing pterygote insect phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54 (2): 651–656.
- Skoda S. R., Pornkulwat S., Foster J. E. (2002): Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research* 92: 89–96.

- Solomon M. G., Cross J. V., Fitzgerald J. D., Campbell C. A. M., Jolly R. L., Olszak R. W., Niemczyk E., Vogt H. (2000): Biocontrol of pests of apples and pears in Northern and Central Europe - 3. Predators. *Biocontrol Science and Technology* 10: 91–128.
- Soufi Z., Komor E. (2014): Latent infection of asymptomatic Hawaiian sugarcane cultivars with 16SrI and 16SrXI phytoplasmas. *Journal of General Plant Pathology* 80: 255–263.
- Stehlík J. L., Heiss E. (2000): Results of investigations of the Hemiptera in Moravia made by the Moravian Museum (Aradidae, Pyrrhocoridae). *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* 85: 333–350.
- Strauss E. (2009): Phytoplasma research begins to bloom. *Science* 325: 388–390.
- Styrsky J. D., Eubanks M. D. (2007): Ecological consequences of interactions between ants and honeydew-producing insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274 (1607): 151–164.
- Sugio A., MacLean A. M., Kingdom H. N., Grieve V. M., Manimekala, R., Hogenhout S. A. (2011): Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* 49 (1): 175–195.
- Suh S.-J., Choi D.-S. (2020): Using DNA barcoding for identification of psyllids (Hemiptera: Psylloidea) intercepted at South Korea ports-of-entry. *Insecta Mundi* 816: 1–10.
- Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.-Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M., Namba S. (2006): Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (11): 4252–4257.
- Tedeschi R., Baldessari M., Mazzoni V., Trona F., Angeli G. (2012): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae) in Northeast Italy and its role in the apple proliferation epidemiology in apple orchards. *Journal of Economic Entomology* 105 (2): 322–328.
- Tedeschi R., Bosco D., Alma A. (2002): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in Northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology* 95 (3): 544–551.
- Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J., Alma A. (2006): Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55 (1): 18–24.
- Tedeschi R., Jarausch B., Delic D., Weintraub P. G. (2013): Actual distribution of fruit tree and grapevine phytoplasma diseases and their vectors in Europe and neighboring regions. *Phytopathogenic Mollicutes* 3 (1): 3–4.

- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673–4680.
- Tobe S. S., Kitchener A., Linacre A. (2009): Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification—An answer to the debate. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2 (1): 306–307.
- Trivellone V., Dietrich C. H. (2021): Evolutionary diversification in insect vector-phytoplasma-plant associations. *Annals of the Entomological Society of America* 114 (2): 137–150.
- Vondráček K. (1957): Mery-Psyloidea: (řád Hmyz stejnokřídly-Homoptera). Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T. van de, Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407–4414.
- Watmough R. H. (1968): Population studies on two species of psyllidae (Homoptera, Sternorhyncha) on broom (*Sarothamnus scoparius* (L.) Wimmer). *The Journal of Animal Ecology* 37 (2): 283.
- Wayadande A. C., Baker G. R., Fletcher J. (1997): Comparative ultrastructure of the salivary glands of two phytopathogen vectors, the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Baker), and the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* DeLong and Wolcott (Homoptera: Cicadellidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 26 (2): 113–120.
- Weinersmith K., Faulkes Z. (2014): Parasitic manipulation of hosts' phenotype, or how to make a zombie - an introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology* 54 (2): 93–100.
- Weintraub P. G., Beanland L. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51 (1): 91–111.
- Weintraub P. G., Wilson M. R. (2010): Control of phytoplasma diseases and vectors. In: Weintraub P. G., Jones P. (eds.): *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, pp. 233–249, CAB International, Wallingford, U.K.
- Wenninger E. J., Hall D. G., Mankin R. W. (2009): Vibrational communication between the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America* 102 (3): 547–555.

- White T. C. R. (1970): The nymphal stage of *Cardiaspina densitexta* (Homoptera: Psyllidae) on leaves of *Eucalyptus fasciculosa*. Australian Journal of Zoology 18 (3): 273.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531–6535.
- Wilson J.-J., Sing K.-W., Jaturas N. (2019): DNA barcoding: bioinformatics workflows for beginners. In: Ranganathan S., Gribskov M., Nakai K., Schönbach Ch. (eds.): Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology, pp. 985–995, Academic Press, Oxford.
- Woodburn T. L., Lewis E. E. (1973): A comparative histological study of the effects of feeding by nymphs of four psyllid species on the leaves of eucalypts. Australian Journal of Entomology 12 (2): 134–138.
- Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., Li Y., Pang X., Xu H., Zhu Y., Xiaio P., Chen S. (2010): Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. PLoS ONE 5(10): e13102.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

- Ouvrard D. (2023) Psyllist-The World Psylloidea Database. <http://www.hemiptera-databases.com/psyllist> - navštívené 4. marca 2023.